

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE

N° attribué par la bibliothèque

[illegible]

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INP Grenoble

Spécialité : Physique pour les Sciences du Vivant

préparée au laboratoire Biopuces, Département Réponse Dynamique Cellulaire,
Direction des Sciences du Vivant, CEA GRENOBLE

dans le cadre de **l'Ecole Doctorale de Physique de Grenoble**

présentée et soutenue publiquement

par

Thomas SORDEL

Le 22 novembre 2006

CONCEPTION ET VALIDATION D'UNE « PUCE PATCH-CLAMP » EN SILICIUM POUR PARALLELISER ET AUTOMATISER LES MESURES ELECTRIQUES SUR CELLULES INDIVIDUALISEES

DIRECTEUR DE THESE : M. Michel LABEAU
CO-DIRECTRICE DE THESE : Mme Nathalie PICOLLET D'HAHAN

JURY

M. Franz BRUCKERT, Président
M. Loïc AUVRAY, Rapporteur
M. Philippe RENAUD, Rapporteur
M. Michel LABEAU, Directeur de thèse
Mme Nathalie PICOLLET D'HAHAN, Co-directrice
M. Michel DE WAARD, Examinateur

Remerciements

Un travail de thèse, qui plus est dans un environnement pluridisciplinaire, ne peut se construire et aboutir sans le concours et le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier.

Pour commencer, je souhaite dire un grand Merci à Nathalie Picollet D'Hahan, encadrante de tous les jours, qui pendant plus de trois années s'est démenée pour que cette thèse se déroule sans encombre. Elle a tenté (et je pense est parvenue) à m'inculquer quelques unes de ses qualités, dynamisme, organisation, rigueur et surtout optimisme. J'ai apprécié partager, aussi avec elle, nos récits des sorties en montagne du week-end. Merci également à Michel Labeau, du laboratoire LMGP de l'INPG, qui a accepté d'être mon directeur de thèse officiel et qui, bien que non initié à la biologie cellulaire, s'est grandement impliqué dans la conduite de mes travaux, tant sur le fond que sur la forme. Je tiens à remercier François Chatelain, directeur du laboratoire Biopuces, pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir fait confiance. Merci également aux membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Ensuite, j'aimerais exprimer toute ma reconnaissance envers tous les membres (de passage ou permanents) du projet Multi-Patch. Chacun d'entre eux a contribué à l'aboutissement de cette recherche et les résultats présentés dans ce manuscrit sont aussi le fruit de leurs efforts. Tout d'abord merci à Frédérique Marcel (puis Kermarrec) pour avoir enseigné au jeune ingénieur que j'étais les bases de la biologie cellulaire. Je ne peux oublier Stéphanie Garnier-Raveaud, post-doc sur le projet, qui a bien voulu me livrer ses secrets et « recettes » si importants en patch : mon professeur particulier d'électrophysiologie en quelques sortes. Au temps des moments difficiles du projet, nous ne suivions qu'une seule devise, certes peu littéraire, mais tellement vraie : « Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir. Donc : plus ça rate et plus on a de chances que ça marche. » (devise Shadoks). Le dernier arrivé sur le projet, Yann Sinquin, a la difficile tâche de prendre ma suite sur le projet ; merci à lui d'avoir appris vite et d'avoir accepté les règles (et parfois manies) de manipulation que je me suis imposées pendant 3 ans. Je souhaite remercier également deux collègues du LETI : Fabien Sauter, pour les discussions et conseils qui ont largement contribué à la construction de ma thèse, et Catherine Pudda, pour la fabrication des puces et passée maître en l'art des dépôts PECVD de dernière minute. Merci aussi à Florence Ricoul, pour son implication et ses conseils au début du projet, à Henry Grateau, Raymond Charles et Venceslass Rat pour la fabrication des pièces mécaniques et électriques. Je n'oublie pas également les stagiaires qui se sont succédés : Céline, première mais non moins marquante stagiaire, Marc, grand bonhomme destiné au patch-clamp sur puce et qui finalement a préféré étudier les canaux de manière plus fondamentale, et Quentin, pour ses travaux sur l'automate. Je tiens à remercier les personnes extérieures au projet qui ont permis de faire avancer ce travail : Christophe Arnoult, pour ses conseils et pour avoir prêté son poste de patch à plusieurs reprises, Michel De Waard, pour ses conseils et sa relecture précieuse de l'article, Olivier Renaud, pour les analyses XPS, François De Crecy pour la construction et l'analyse du plan d'expériences et l'équipe de Michel Vivaudou pour les discussions.

Je souhaite également remercier l'ensemble des autres membres du laboratoire Biopuces. Il ne m'est malheureusement pas possible de les citer un par un, mais je tiens à exprimer un merci spécial à certains d'entre eux. Tout d'abord à Lamya Ghenim, pour sa contribution dans les discussions de physique et ses relectures pertinentes, Alexandra Fuchs pour ses corrections en anglais, et Vincent Haguët pour les discussions scientifiques que nous avons eues et ses conseils. Patricia Lecluyse est la secrétaire efficace et dynamique des Biopuces que je

Remerciements

souhaite remercier spécialement (ne serait-ce que parce qu'elle sait mesurer dans les justes proportions une personne). Merci aux trois autres thésards : Laurent (quel beau voyage en Suède !), Julien (pour avoir tant couru durant les matchs de squash) et Guillaume (pour nous avoir fait découvrir les vins étrangers). L'ambiance joviale qui règne à la pause café du laboratoire, n'est pas sans rapport avec la présence de Raphaël. Je tiens à remercier ce franc-comtois, d'abord parce que tout comme moi il est fier de l'être, et puis pour ses coups de mains, ses expressions savoureuses et les bons moments passés ensemble. La vie des « jeunes » du laboratoire (pour ne pas faire débat, se considérera jeune qui veut) ne serait pas ce qu'elle est sans Delphine. Grande organisatrice d'activités extra professionnelles, c'est elle qui a inventé le concept de soirée « Travaux, Rénovations et Repas ». Merci à elle, pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Enfin, ce travail n'aurait pas abouti sans le soutien moral et l'intérêt manifestés par mes amis du Jura (un merci spécial à Romain) et de Grenoble, et ma famille. Un grand Merci à mes parents de m'avoir soutenu et parfois poussé à arriver jusque là et à qui j'annonce enfin : « les études, j'arrête ! ». Les derniers mots reviennent à celle qui me ravit tous les jours et sans qui je n'aurais pas pu effectuer ma thèse dans la bonne humeur, merci à toi Anne...

Table des matières

Glossaire.....	9
Introduction	11
1. Contexte de l'étude : les puces à cellules	12
1.1. Les biopuces	12
1.2. Des puces à ADN aux puces à cellules	12
2. Les puces à cellules pour mesurer l'activité électrique des cellules.....	14
2.1. Mesures des courants extracellulaires par les réseaux d'électrodes.....	14
2.2. Mesure de l'activité électrique intracellulaire, le patch-clamp sur puce	14
3. Objectif de la thèse	15
Chapitre 1 : Mesures électriques sur cellules individualisées.....	17
A. Pourquoi et comment mesurer des courants ioniques intracellulaires ?	18
1. Les canaux ioniques	18
1.1. La cellule et les canaux ioniques.....	18
1.2. La diversité des canaux ioniques.....	20
1.3. Mise en équation de la théorie ionique.....	21
1.4. Rôles physiologiques des canaux ioniques et grandes fonctions cellulaires.....	22
1.5. Exemple des canaux potassiques.....	23
1.6. Techniques d'étude des canaux ioniques	24
2. Le patch-clamp	24
2.1. Principe et mise en oeuvre	25
2.2. Les types cellulaires couramment utilisés	27
2.3. Configurations de mesure.....	28
2.4. Principe de l'électronique de patch-clamp, circuit électrique équivalent de la cellule	29
2.5. Enregistrements de courants, exemples	31
3. Le patch-clamp : un outil de la recherche pharmacologique	32
3.1. Implication des canaux ioniques dans les pathologies	32
3.2. Le patch-clamp dans le processus d'identification de molécules thérapeutiques .	34
B/ Emergence de nouvelles technologies	36
1. Les promesses des microsystèmes : pourquoi automatiser et paralléliser les mesures de patch-clamp ?	36
2. Enregistrements de courants cellulaires automatisés	37
2.1. Automatisation basée sur l'utilisation de la pipette de verre.....	37
2.2. Cartes micro fluidiques pour patch-clamp conventionnel.....	38
2.3. Limites de ces systèmes	39
3. Patch-clamp planaire et transverse	39
3.1. Principe et historique du patch-clamp sur puce.....	39
3.2. Etat de l'art, présentation	40
3.3. Verrous technologiques.....	43
4. Présentation du projet de recherche	45
Chapitre 2 : Conception et développement du démonstrateur Multi-Patch	49
A. Un assemblage sandwich modulaire	50
1. Introduction	50
2. Puce en Silicium.....	50
2.1. Présentation de la puce	50

2.2. Détail du procédé de fabrication	52
3. Assemblage et poste de mesure.....	53
3.1. Description des différents éléments assemblés	53
3.2. Connexion fluidique.....	55
3.3. Connexion électrique.....	55
3.4. Poste de mesure	56
4. Formation du scellement: principe et déroulement	56
4.1. « Mise en eau » du système et mesures à vide	56
4.2. Formation du scellement et passage en cellule entière.....	56
4.3. Mesure des courants	57
B. Etablissement d'un protocole de test, preuve de faisabilité	57
1. Nettoyage des puces	57
2. Validation de la fluidique et suspension cellulaire.....	58
2.1. Protocole de remplissage.....	58
2.2. Suspension cellulaire	59
3. Mesures de scellements des cellules sur la puce	61
3.1. Introduction: premières constatations	61
3.2. Conception d'une nouveau type de puces	61
3.3. Caractérisations des puces.....	61
3.4. Le dépôt SiO ₂ PECVD améliore le scellement des cellules.....	63
4. Enregistrements de courants ioniques sur cellules recombinantes.....	64
4.1. Choix des modèles de canaux ioniques.....	64
4.2. Résultats	65
C. Discussion	67
1. Preuve de concept.....	67
2. Optimisation des performances de la puce.....	68
2.1. Vers une approche multiparamétrique	68
2.2. Diminution de la capacité des puces	69
Chapitre 3 : Optimisation de l'interaction cellule/microtrou	71
A. Paramètres influents sur le scellement	72
1. Introduction	72
2. Interactions membrane cellulaire/surface : état des connaissances.....	72
2.1. Structure du substrat.....	72
2.2. Membrane cellulaire et notions d'adhérence.....	73
2.3. Interaction membrane/substrat	74
3. Géométrie de l'orifice et paramètres de surface.....	77
3.1. Forme de la pipette de verre ou du microtrou	77
3.2. Paramètres de surface.....	78
3.3. Préparation cellulaire.....	78
4. Approches du problème	79
4.1. Objectifs	79
4.2. Stratégie adoptée	80
B. Préparation cellulaire.....	81
1. Décollement des tapis cellulaires	81
2. Optimisation du protocole de préparation de la suspension cellulaire.....	82
2.1. Différents protocoles de préparation étudiés.....	82
2.2. Résultats	83
3. Discussion	84

C. Propriétés physicochimiques du microtrou	84
1. Configuration de la matrice de plan d'expériences idéale	84
2. Mise en œuvre d'une matrice d'expériences simplifiée	86
2.1. Choix technologiques	86
2.2. Conséquences des problèmes rencontrés sur le plan d'expériences.....	87
2.3. Préparation des puces	88
3. Caractérisations des puces.....	89
3.1. Principes des outils de caractérisation.....	89
3.2. Résultats	93
4. Valeurs de scellement.....	98
4.1. Mise en œuvre de la mesure	99
4.2. Effet du plasma oxygène	99
4.3. Effet du matériau en surface.....	100
4.4. Effet du diamètre du microtrou	100
4.5. Effet de l'épaisseur de la membrane de diélectrique et de la rugosité	101
D. Discussion et conclusion	102
1. Bilan sur l'influence des paramètres de la puce	102
2. Exploitation des résultats par le plan d'expériences	103
2.1. Préparation de l'analyse	103
2.2. Analyse des résultats	104
2.3. Conclusion.....	105
3. Conclusion et design de la puce « optimale »	105
 Chapitre 4 : Optimisation de la capacité de la puce et validations électrophysiologiques	107
A. Sensibilité du système et réduction de la capacité de la puce	108
1. Présentation du problème	108
2. Les sources de bruit en électrophysiologie	108
2.1. Sources de bruits externes	109
2.2. Sources de bruits internes.....	110
3. Capacité de la puce en silicium	113
3.1. Notion de capacité pour un substrat planaire	113
3.2. Modèle électrique équivalent de la puce	113
4. Mesures de capacités par spectrométrie d'impédance	116
4.1. Principe de la mesure	116
4.2. Identification et étude du modèle électrique équivalent.....	116
4.3. Validation du modèle, exemples de mesures de capacité	118
5. Réduction des capacités des puces	120
5.1. Réduction de la surface de contact des fluides.....	120
5.2. Augmentation de l'épaisseur de matériau diélectrique et renforcement de la couche d'oxyde sur les faces de la gravure humide	121
6. Discussion	122
6.1. Réduction du bruit dans les mesures	122
6.2. Réduction de la capacité : limites et solutions potentielles	123
B. Validation biologique sur des modèles de canaux ioniques utilisables en criblage	124
1. Introduction	124
2. Canaux IRK1	125
2.1. Amélioration de la qualité des enregistrements	125
2.2. Stabilité des scellements, courbes dose-réponse	126
3. Validation biologique sur les canaux hERG	126

3.1. Intérêt des canaux hERG en pharmacologie	126
3.2. Enregistrements des courants hERG sur la puce en silicium	127
4. Mesure de capacité membranaire, exemple des canaux BK(Ca) T-Rex	129
4.1. Présentation de la lignée inductible BK(Ca) T-rex	129
4.2. Etude de l'induction de l'expression des canaux BK(Ca) par la Tetracycline....	130
C. Du démonstrateur au prototype de laboratoire.....	131
1. Performances de la puce en silicium	131
2. Limites du système d'assemblage	132
Chapitre 5 : Vers un prototype de laboratoire.....	133
A. Parallélisation et automatisation du système	134
1. Introduction	134
1.1. Objectif	134
1.2. « Grandes lignes » du cahier des charges.....	134
2. Système d'assemblage.....	135
2.1. Présentation du système	135
2.2. Choix technologiques	138
2.3. Performances	140
3. Pilotage du système	140
3.1. Fonctions du logiciel	140
3.2. Asservissement de la pression selon la résistance de scellement.....	141
4. Conclusion.....	142
B. Perspectives de valorisation	143
1. Introduction	143
2. Patch ovocytes.....	143
2.1. Intérêt des ovocytes en patch-clamp	143
2.2. Objectifs du projet	144
3. Puce Multi-Patch à haute valeur ajoutée	144
3.1. Un automate dédié au criblage pharmacologique sur cellules transfectées transitoirement.....	144
3.2. Une puce en silicium « multi-fonctions »	145
4. Applications parallèles	146
4.1. Membrane lipidique sur puce en silicium	146
4.2. Comptage de particules	146
Conclusion	149
1. L'évolution des performances du système Multi-Patch en chiffres	150
2. Mise en place d'une méthode systématique	151
3. Travailler dans un environnement pluridisciplinaire	152
Références	153
Annexes	161

Glossaire

ADN	: Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	: ADN copie
AFM	: Atomic Force Microscopy
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNm	: ARN messenger
ATP	: Adénosine TriPhosphate
BK	: Maxi K _{Ca} (canal ionique potassique voltage-dépendant, sensible au calcium)
CCD	: Charge Coupled Device
CE	: Electrode auxiliaire
CHO	: Chinese Hamster Ovary
DEP	: Diélectrophorèse
ESCA	: Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
EWOD	: ElectroWetting On Dielectric
FAR	: Face Arrière
FAV	: Face Avant
FET	: Field Effect Transistor
GABA	: Gamma-Amino Butyric Acid
GFP	: Green Fluorescent Protein
HEK-293	: Human Embryonic Kidney
hERG	: human Ether a-go-go Related Gene
IbTX	: Iberiotoxine
ChTX	: Charybdotoxine
IC50	: Concentration de médicament pour obtenir une inhibition de 50 % des canaux
IRK1	: Inward Rectifier Potassium
LPCVD	: Low Pressure Chemical Vapor Deposition
MEA	: Multi-Electrodes Array
MEB	: Microscopie Electronique à Balayage
MEC	: Matrice ExtraCellulaire
μTAS	: microTotal Analysis System
PBS	: Phosphate Buffer Salin
PDMS	: Poly-DiMéthylSiloxane
PECVD	: Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PEEK	: Poly-EtherEtherKetone
PSD	: Power Spectral Density
REF	: Electrode de référence
RIE	: Reactive Ion Etching
TEOS	: TetraEthyl OrthoSilicate
Terf	: Terfénadine
Tet	: Tétracycline
WE	: Electrode de mesure
XPS	: X-ray Photoelectron Spectroscopy

Introduction

1. Contexte de l'étude : les puces à cellules

1.1. Les biopuces

Une biopuce est représentée par un ensemble de sites de mesure disposés sur un substrat solide miniaturisé pour permettre de réaliser un grand nombre de tests simultanément [1]. On distingue aujourd'hui trois types de biopuces :

- les puces à macromolécules, comme les puces à ADN ou à protéines,
- les puces à cellules,
- les laboratoires sur puce.

Le développement des biopuces répond à une demande grandissante des industries de biotechnologie, dont les efforts de recherche se concentrent sur divers domaines de la biologie incluant la génomique, la protéomique, la bioinformatique et la pharmacologie...[2]. Les avancées dans ces secteurs donnent aux scientifiques de nouvelles méthodes pour démêler les processus biochimiques complexes se produisant à l'intérieur des cellules dans le but de pouvoir diagnostiquer et traiter les maladies. En parallèle, l'industrie du semi-conducteur a développé une large gamme de techniques de microfabrication. Le rapprochement de ces deux sciences a permis aux biologistes de réduire et d'adapter leurs systèmes de mesures, souvent encombrants, dans des espaces de plus en plus petits, que l'on nomme aujourd'hui biopuces. Ces systèmes sont aussi appelés, dans leur forme la plus intégrée, laboratoire sur puces ou encore μ TAS, pour Micro Total Analysis Systems [3].

Le diagnostic représente l'application la plus visée par les biopuces et de nombreux dispositifs ont été développés et présentés dans la littérature ces dernières années [3-6]. Ces biopuces diffèrent par leur principe de détection (optique, électrique ou mécanique), par leur technique de fabrication (sur silicium, verre, plastiques, polymères ou substrats biologiques) et par le domaine d'application qu'elles visent [2, 7]. Cependant, dans tous les cas, l'utilisation des techniques de micro et nano détection est justifiée par :

- la réduction de la taille du détecteur à l'échelle de la cible étudiée pour accroître la sensibilité de la mesure,
- la réduction des volumes de réactifs et des coûts associés,
- la réduction du temps des tests par la parallélisation des mesures, et l'augmentation des rendements de tests,
- la réduction de l'encombrement et la miniaturisation de l'ensemble du système de mesure (portabilité de certains systèmes).

1.2. Des puces à ADN aux puces à cellules

L'exemple de biopuces le plus connu est représenté par les puces à ADN, apparues au cours des années 80 mais dont le réel développement débute à partir des années 90 [1]. Ces puces portent des sondes génétiques (séquences connues d'ADN) à leur surface et permettent d'analyser des échantillons biologiques pour des applications de diagnostic génétique par exemple [8]. Durant ces dix dernières années, les puces à ADN à haute densité ont permis de révolutionner la biomédecine et d'accélérer la validation des cibles et la découverte de médicaments [9]. L'essor des puces à ADN a mené au développement de laboratoires sur puces. Ces systèmes miniaturisés conçus pour intégrer des étapes successives de

transformation et d'analyse de l'échantillon répondent à un besoin d'analyse automatique, haut débit et à bas coût.

Le succès des puces à ADN a inspiré le développement de puces à cellules, biopuces destinées à analyser le plus petit échantillon « intégré » vivant, la cellule. Ces dispositifs permettent de manipuler et d'analyser un grand nombre de cellules à l'échelle de la cellule unique. Les puces à cellules possèdent des contraintes spécifiques car elles font interagir une entité vivante avec des matériaux inertes :

- les matériaux utilisés doivent être biocompatibles,
- les surfaces présentent en général des revêtements pour favoriser ou empêcher l'adhérence des cellules,
- le système doit alimenter constamment les cellules en liquide nutritif ou d'analyse.

Les puces à cellules développées aujourd'hui sont très diverses tant par leurs applications que par les techniques qu'elles utilisent, mais on peut les séparer en deux grandes catégories :

- les puces comportant des cultures ou des tissus cellulaires.
De telles puces comportent en général des surfaces permettant de contrôler l'adhérence cellulaire et de localiser le développement de la population cellulaire sur des plots réalisés par des revêtements de polymères, de protéines,... [10-12]. Le comportement d'un ensemble de cellules organisées peut être étudié sur des puces passives ou actives. Sur les puces passives, le phénotype des cellules, la différenciation cellulaire, l'adhérence, etc, sont en général analysés par des méthodes fluorescentes ou optiques [11, 13]. Les puces actives sont, elles, constituées de réseaux d'électrodes (ou de capteurs CCD, Charge Coupled Device) sur lesquelles les cellules sont mises en culture [14-16]. Les mesures potentiométriques ou ampérométriques permettent alors d'étudier les effets toxiques et thérapeutiques de substances, les phénomènes d'adhérence cellulaire, la communication neuronale [16] ou encore de simuler des dommages *in vivo* [6].
- les puces dédiées aux cellules individualisées.
Parmi ces dispositifs, on trouve tout d'abord des systèmes destinés à la manipulation de cellules uniques pour des applications comme le tri cellulaire, le comptage, la transfection [17]... De tels systèmes permettent de manipuler les cellules par des méthodes mécaniques à l'aide de filtres, par cytométrie de flux dans des réseaux microfluidiques [5, 12, 18], électriques par diélectrophorèse [19, 20], magnétiques [21, 22], ou encore optiques [23, 24].
On recense ensuite des dispositifs destinés à l'analyse de la cellule individuelle. Cette analyse de la cellule unique pour des applications pharmacologiques ou encore pour la compréhension des mécanismes cellulaires peut être réalisée de manière électrique (mesures de patch-clamp sur puce) ou optique (analyse en fluorescence du flux calcique sur une cellule unique [25]) [3, 5].

Dans le cadre de cette thèse nous allons nous intéresser à des puces permettant d'enregistrer l'activité électrique des cellules pour des applications de criblage de molécules thérapeutiques.

2. Les puces à cellules pour mesurer l'activité électrique des cellules

2.1. Mesures des courants extracellulaires par les réseaux d'électrodes

L'activité électrique des cellules peut être enregistrée à l'aide de réseaux de microélectrodes, ou MEA (Multi-Electrode Array) [26]. Cette technique offre la possibilité d'enregistrer des courants extracellulaires de manière non invasive sur plusieurs emplacements simultanément. Les cellules sont en fait mises en culture sur un substrat comportant un réseau d'électrodes connectées à une électronique de mesure pour enregistrer des courants ioniques. A ce jour, deux technologies existent :

- l'utilisation d'électrodes métalliques passives, reliées à une électronique de mesure extérieure,
- l'utilisation de réseaux de transistor à effet de champ (FET, Field Effect Transistor) sur des substrats en silicium [27].

Les dispositifs MEA répondent à la nécessité industrielle d'examiner les composés choisis contre les cibles que sont les canaux ioniques. En effet cette technologie peut être utilisée pour l'étude :

- des organes entiers comme le cœur. Dans ce cas, c'est l'électrocardiogramme qui est enregistré [28],
- des tranches organotypiques (qui préservent l'organisation 3D tissulaire de la structure étudiée) [29],
- des cultures de cellules dissociées, comme pour l'étude des neurones [30, 31].

Ces systèmes *in vitro* sont idéaux pour surveiller des effets aigus et chroniques des drogues ou des toxines et pour réaliser des études fonctionnelles dans les conditions physio-pathologiques qui miment des dommages *in vivo*. En enregistrant la réponse électrique à divers endroits du tissu cellulaire cultivé sur la puce, une carte spatiale des effets d'une drogue à différents emplacements peut être produite, fournissant des indices importants sur la spécificité de la drogue [32].

2.2. Mesure de l'activité électrique intracellulaire, le patch-clamp sur puce

Les canaux ioniques sont des protéines présentes sur la membrane plasmique de toute cellule. Ce sont de véritables « portiers cellulaires » qui régulent les flux d'ions entre les milieux intra et extra-cellulaires en réponse à des stimuli divers (mécaniques, chimiques, thermiques...). Ils sont à la base de nombreux processus physiologiques comme la communication nerveuse, la contraction musculaire, la sensation tactile, etc. Ces protéines canal sont donc l'objet de nombreuses études fondamentales dans les domaines de la recherche publique et privée (industries pharmaceutiques). Aujourd'hui un nombre croissant de dysfonctionnements des canaux ioniques sont identifiés et désignés comme responsables de pathologies. Ils sont devenus des cibles incontournables pour le criblage de molécules thérapeutiques et les industries pharmaceutiques expriment le besoin de techniques d'investigation sensibles et rapides.

En 1976, Sakmann et Neher mettent au point la technique du patch-clamp qui, grâce à une micropipette de verre en contact avec une cellule unique, permet d'enregistrer les courants

ioniques intracellulaires. Cette technique est aujourd'hui la méthode de référence pour l'étude de l'activité électrique des cellules. Basée sur un principe de mesure simple, cette méthode permet d'obtenir des enregistrements de très bonne qualité et même de mesurer en temps réel l'activité électrique d'un canal ionique unique. Cependant, elle requiert un équipement lourd, les compétences d'un expérimentateur confirmé et souffre d'un faible rendement des mesures. Au début des années 2000, un nouveau format de cette technique apparaît, le patch-clamp planaire, ou patch-clamp sur puce [33]. Il s'agit de remplacer la micropipette, par un substrat plan composé de microtrous hébergeant les cellules à étudier.

Ce nouveau format ouvre la voie vers la parallélisation et l'automatisation des tests en s'appuyant sur les progrès des techniques de microfluidique et de microélectronique.

3. Objectif de la thèse

J'ai mené mon travail de thèse au sein du projet Multi-Patch visant à développer un système dédié à l'analyse des courants ioniques de cellules individualisées par la technique du patch-clamp planaire. Pendant trois années, j'ai eu comme objectif de concevoir, caractériser et valider une puce de patch-clamp en silicium destinée à être intégrée dans un automate.

Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire Biopuces, créé en 2001 au sein de la Direction des Sciences du Vivant du CEA¹ à Grenoble, et en partenariat étroit avec le Laboratoire des Composants Intégrés pour le Vivant du LETI². C'est dans un environnement résolument pluridisciplinaire, au centre de la biologie, la physique et la chimie, que cette recherche a mûri et évolué.

Pour mener à bien cette étude et atteindre l'objectif fixé, plusieurs étapes ont été nécessaires et sont décrites dans ce manuscrit :

- compréhension des principes entourant la mesure des courants ioniques sur cellules, et analyse de l'état de l'art (chapitre 1),
- développement d'un démonstrateur et preuve de faisabilité (chapitre 2),
- optimisation des paramètres de la puce afin d'obtenir un outil de mesure performant et sensible (chapitres 3 et 4),
- validations électrophysiologiques sur des canaux ioniques d'intérêt pour des applications pharmacologiques (chapitre 4),
- conception d'un automate pré-industriel et implications dans des projets transverses dont le principe est basé sur la mesure de courants ioniques (chapitre 5).

¹ Commissariat à l'Energie Atomique

² Laboratoire d'Electronique de Technologie de l'Information

Chapitre 1 : Mesures électriques sur cellules individualisées

A. Pourquoi et comment mesurer des courants ioniques intracellulaires ?

1. Les canaux ioniques

1.1. La cellule et les canaux ioniques

La membrane cellulaire est une enveloppe qui délimite, entoure et protège la cellule. Elle enferme le cytoplasme de la cellule et délimite deux compartiments : le compartiment intracellulaire et le compartiment extracellulaire. On parle de membrane plasmique lorsque celle-ci délimite une cellule et de membranes intracellulaires lorsque celles-ci délimitent un organe (membrane mitochondriale, nucléaire, lysosomiale ...) (Figure 1).

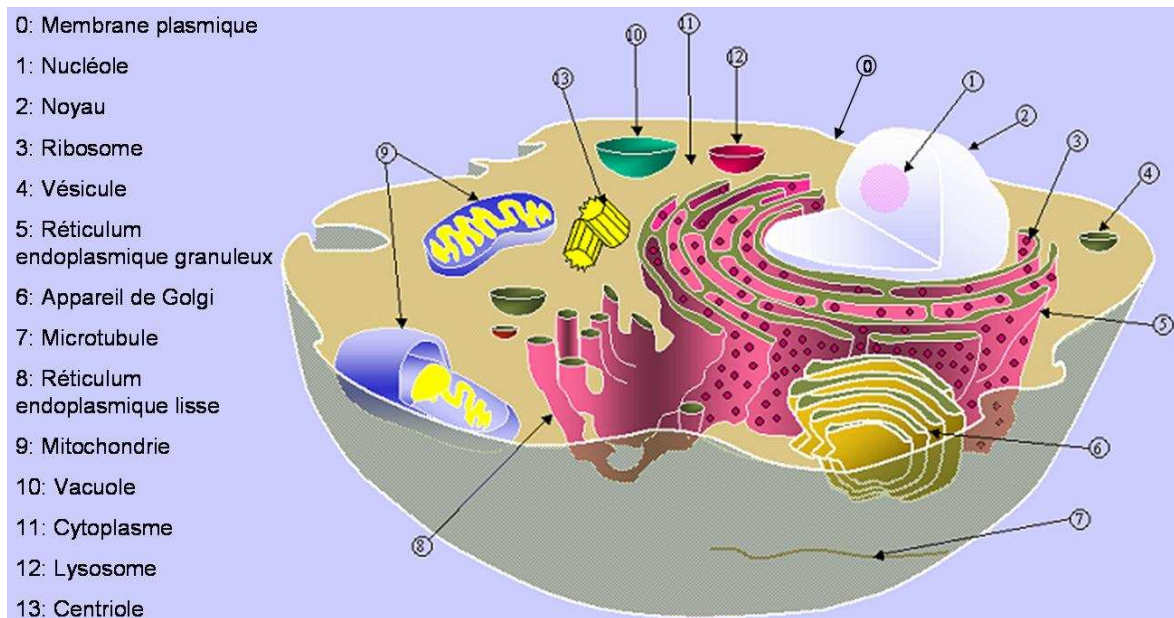


Figure 1 : structure d'une cellule eucaryote typique (source : <http://www.wikipedia.fr>)

En premier lieu, les membranes biologiques constituent une barrière sélective entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Elles sont constituées d'une bicouche lipidique dont le centre hydrophobe bloque totalement le passage des ions inorganiques (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , ...) et freine la diffusion des solutés organiques polaires (oses, acides aminés...). En elles-mêmes, les membranes ne sont perméables qu'aux petites molécules hydrophobes (O_2 , N_2 , glycérol...), mais elles servent de support à de nombreuses protéines membranaires ayant pour rôle de réguler les échanges transmembranaires (canaux ioniques pour les transferts d'ions, aquaporines pour le transfert d'eau...). Il est possible de distinguer 3 catégories de transferts à travers la membrane :

- la diffusion : diffusion de composés directement à travers la bicouche lipidique,
- le transport passif facilité : transport de composés à travers la bicouche lipidique grâce à une protéine-transporteur,
- le transport actif : transport de composés à travers la bicouche lipidique grâce à une protéine-transporteur et une consommation d'énergie.

Plus généralement, la membrane sert de barrière sélective à l'information biologique. Cette information prend la forme d'une hormone, d'un sucre, d'une protéine, etc. Elle est captée par des récepteurs membranaires, c'est-à-dire des protéines capables de reconnaître spécifiquement un composé. Cette reconnaissance enclenche un mécanisme de signalisation cellulaire aboutissant à une réaction de la cellule en réponse au signal qu'elle a reçu.

Qu'il s'agisse du transport passif facilité ou du transport actif, le gradient électrochimique joue un rôle fondamental. Il est dû à l'asymétrie des concentrations intra et extra cellulaires des différents ions et solutés [34] (Tableau 1). Cette asymétrie est à l'origine d'un potentiel, appelé potentiel de membrane, entre les milieux intra et extra cellulaires.

<i>Ion</i>	<i>Concentration intracellulaire (mM)</i>	<i>Concentration extracellulaire (mM)</i>
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	30	1-2
Ca ²⁺	1-2	2,5-5
H ⁺	5 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁷
Cl ⁻	4	110

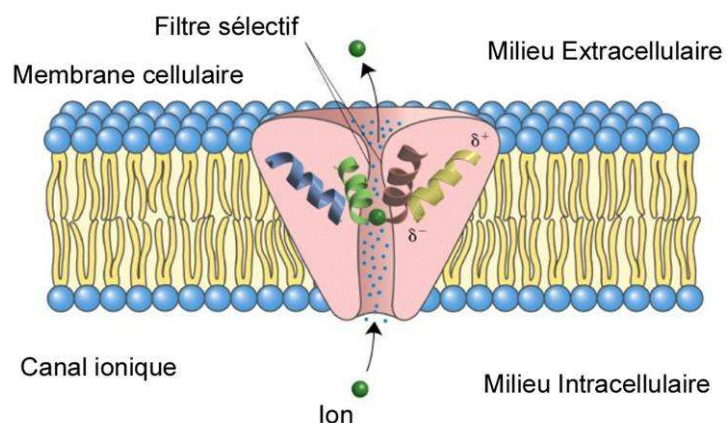
Tableau 1 : Concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur d'une cellule de mammifère.

Dans le cas d'un transport actif, les espèces peuvent transiter contre leur gradient électrochimique, ce qui nécessite un apport d'énergie important (hydrolyse de l'ATP par exemple) pour des flux souvent faibles (1 à 1000 ions/sec).

En ce qui concerne le transport passif facilité, les mouvements des solutés sont régis par le gradient électrochimique et par le potentiel de membrane s'il s'agit de solutés chargés. La circulation est libre ou non selon que le pore protéique est ouvert ou fermé. Les flux sont beaucoup plus élevés que dans le premier mode de transport (10⁶ à 10⁸ ions/sec).

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires qui permettent les échanges d'ions selon le mécanisme de transport passif facilité. Ils sont présents sur la membrane de toutes les cellules et sont de véritables portiers cellulaires en terme d'échanges d'ions : ils assurent la régulation des flux d'ions à travers la membrane cellulaire (Figure 2). Les canaux s'ouvrent ou se ferment en réponse à des stimuli (chimiques, mécaniques...) et deviennent donc perméables ou non à une espèce ionique [35].

Figure 2 : exemple d'un canal ionique inséré dans une membrane cellulaire. Le canal est un filtre sélectif pour une espèce d'ion précise.



A travers ces quelques premières lignes, on comprend que plusieurs définitions des canaux ioniques vont coexister [36]. En effet du point de vue de la biologie moléculaire, un canal ionique est un assemblage de protéines, constitué de sous-unités, elles-mêmes constituées de domaines et de segments définissant la spécificité du canal (sélectivité, mode d'activation, type de réponse à la stimulation...). D'un point de vue biologie cellulaire, le canal ionique est un vecteur de flux ioniques. Enfin d'un point de vue électrophysiologique, et c'est celui-ci que nous garderons en tête pour la suite de la lecture, un canal ionique est une résistance au travers de laquelle se dissipe un courant, autrement dit un canal ionique est un transducteur capable de transformer directement un signal (chimique, variation de potentiel, mécanique...) en un signal électrique généré par un flux d'ions.

1.2. La diversité des canaux ioniques

Les canaux ioniques constituent une famille de protéines extrêmement diverse et présentent des structures, des modes de régulations, et des rôles physiologiques très variés. Toutefois, ils peuvent être classés en plusieurs sous familles, ou paramètres, énumérés ci-dessous.

Les canaux ioniques se différencient tout d'abord par leur sélectivité ionique, c'est-à-dire par le type d'ions qui circulent à travers. Ainsi on parlera de canaux calciques, sodiques, chlorures ou encore potassiques. Chaque type de canal ionique est un filtre sélectif à une ou plusieurs espèces d'ions (certains canaux laissant circuler tous les cations monovalents, ou tous les cations divalents...) [35, 36].

La diversité des canaux ioniques repose également sur leur mode d'activation. Il existe ainsi des canaux voltage-dépendants, chemo-sensibles, mécano-sensibles, photo-sensibles et couplés à une protéine G (Figure 3).

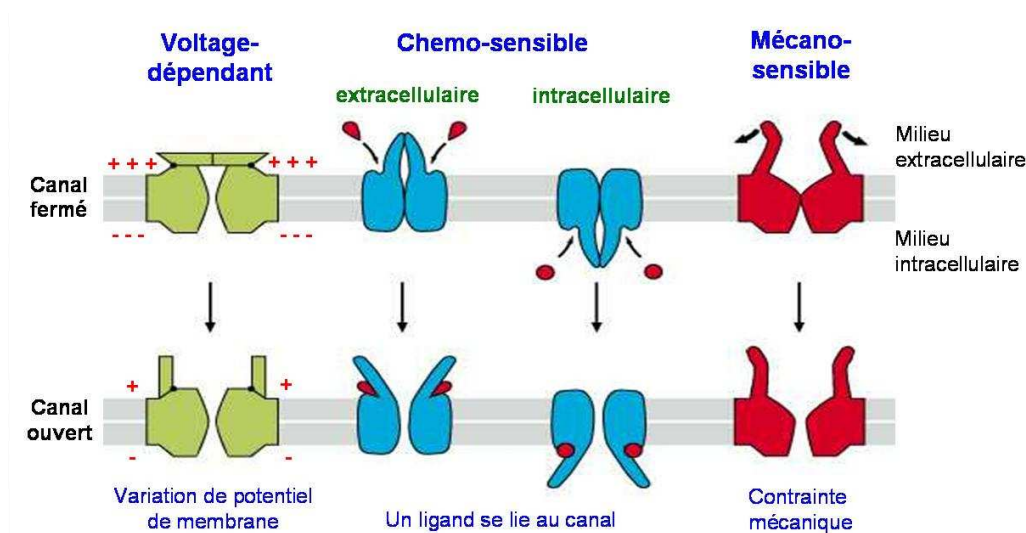


Figure 3 : schéma de principe du mode d'activation des trois principaux types de canaux : voltage-dépendant, chemo-sensible et mécano-sensible.

- Canaux voltage-dépendants : ils s'ouvrent ou se ferment en réponse à une modification du potentiel de membrane, c'est-à-dire à un changement de charges au niveau de la membrane plasmique. Ils sont présents dans les cellules dites excitables comme les neurones ou les cellules musculaires.
- Canaux chemo-sensibles : leur activation dépend d'un ligand spécifique, une petite molécule qui se fixe sur un site de liaison du canal. Les ligands (et donc leur site de

liaison) peuvent être intra ou extracellulaires. L'exemple le plus connu est celui de l'acétylcholine, un neurotransmetteur qui provoque l'ouverture de canaux cationiques et initie l'impulsion nerveuse ou la contraction musculaire.

- Canaux mécano-sensibles : ces canaux sont sensibles à toute contrainte mécanique imposée de manière directe ou indirecte sur la membrane cellulaire. Ainsi la pression acoustique sur les cellules de l'oreille interne déclenche un pulse nerveux interprétable par le cerveau.
- Canaux photo-sensibles : ces canaux sont sensibles à la lumière de manière indirecte la plupart du temps ; les cellules rétiniennes (les cônes) transforment par exemple le signal électromagnétique de la lumière en un signal électrique.
- Canaux couplés à une protéine G : dans un certain nombre de cas, récepteur et canal sont deux protéines différentes et séparées l'une de l'autre. Le couplage est assuré par une protéine G qui module directement, ou via un second messenger, l'activité du canal.

Le profil électrophysiologique du canal est lui aussi un critère à prendre en compte : sens du courant, c'est-à-dire le sens de circulation des ions, conductance unitaire du canal, temps d'activation ou d'inactivation... Ce point sera traité plus en détail dans le paragraphe 2.1 de ce chapitre.

Enfin, les canaux se différencient par leur localisation (canaux de la membrane plasmique ou canaux endocellulaires), selon l'organisme qui les exprime (procaryotes, eucaryotes, mammifères, plantes...) et leur pharmacologie (sensibilité à différents bloqueurs ou activateurs, tels que des toxines, des ions ou des agents pharmacologiques).

1.3. Mise en équation de la théorie ionique

Les flux d'ions à travers des canaux ioniques ouverts sont dirigés selon le gradient électrochimique de l'espèce ionique X considérée entre les milieux extra et intra cellulaires [35, 37]. On définit alors un potentiel d'équilibre, ou potentiel de diffusion de l'ion X, en s'appuyant sur l'équation de Nernst :

$$V_{eq} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_e}{C_i} \quad \text{Équation 1}$$

avec :

C_e et C_i les concentrations extra et intra cellulaires de l'espèce d'ion considérée (mol^{-1})

R la constante des gaz parfaits ($8,31 \text{ V.C.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

T la température (en K)

F la constante de Faraday ($9,62.10^4 \text{ C.mol}^{-1}$)

z la charge de l'ion considéré

V_{eq} est le potentiel d'équilibre de l'ion X, c'est-à-dire le potentiel de membrane pour lequel le gradient électrochimique est nul et pour lequel il n'y a donc pas de flux d'ions sensible au niveau du canal. Le potentiel d'équilibre dépend des concentrations internes et externes de l'ion X. Lorsqu'un canal s'ouvre dans une situation physiologique donnée, le potentiel de membrane V_m n'est plus égal au potentiel d'équilibre de l'ion X, un flux d'ions se produit et génère un courant défini par :

$$I_X = g_X (V_m - V_{eq}) \quad \text{Équation 2}$$

Le courant ionique est fonction de la conductance g_x du type de canal, et du gradient électrochimique ($V_m - V_{eq}$).

Le courant est positif lorsque $(V_m - V_{eq}) > 0$; il est alors dit, par convention, sortant et dirigé de la face interne vers la face externe de la membrane. Il correspond soit à un influx d'ions négatifs, soit à un efflux d'ions positifs. Un courant sortant est hyperpolarisant.

Le courant est négatif lorsque $(V_m - V_{eq}) < 0$; il est alors dit entrant et dirigé de la face externe vers la face interne de la membrane. Il correspond soit à un efflux d'ions négatifs, soit à un influx d'ions positifs. Un courant entrant est dépolarisant [35, 38] (Figure 4).

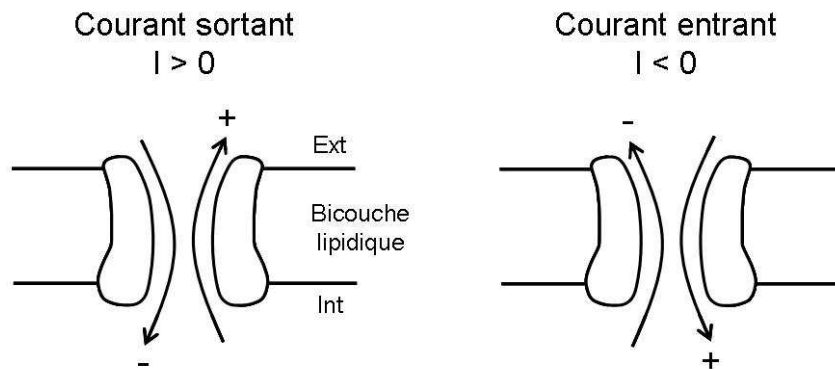


Figure 4 : convention de signe des courant ioniques à travers un canal.

Enfin, certains canaux sont rectifiants soit entrants soit sortants. Une rectification correspond à une variation non linéaire de l'intensité du courant en fonction d'une certaine gamme de tension imposée. En effet, la relation entre le courant et la tension est normalement linéaire dans les conditions simples de la loi d'Ohm, cependant un canal ne se comporte pas toujours comme une résistance pure. Le plus souvent d'autres ions non perméants sont dirigés vers le canal ionique sous l'effet du potentiel imposé et encombrent le passage d'autant plus fortement que le potentiel est grand. De plus ce blocage est localisé du côté où l'ion perméant est le plus fortement concentré ou peut le mieux se lier au canal, expliquant que la rectification ne se fasse que dans un sens.

1.4. Rôles physiologiques des canaux ioniques et grandes fonctions cellulaires

Nous l'avons vu, les canaux ioniques sont présents dans toutes les cellules au niveau de leurs membranes plasmiques et endocellulaires et jouent des rôles importants et multiples dans la communication intra et inter cellulaire.

Ils sont ainsi à la base de nombreux processus physiologiques chez les êtres vivants et sont impliqués par exemple lors de chaque battement de cœur, de chaque mouvement, de chaque pensée ou encore dans la sensation tactile ou la perception visuelle [35, 36, 39]. Ainsi ils participent au phénomène d'excitabilité cellulaire : dans les cellules dites excitables, les dépolarisations et mouvements ioniques qu'ils provoquent assurent des phénomènes tels que l'initiation, la propagation du potentiel d'action et la contraction cellulaire. Dans les cellules non excitables, ils sont impliqués dans la sensibilité de certains récepteurs sensoriels, mais aussi la sensibilité aux hormones (insuline, exocrine) et aux neurotransmetteurs.

1.5. Exemple des canaux potassiques

L'ion potassium, qui demeure le cation le plus abondant dans les cellules animales et végétales, joue un rôle primordial dans le maintien du potentiel de membrane et le contrôle du potentiel osmotique. Ainsi, parmi tous les types de canaux, je souhaite développer l'exemple des canaux potassiques, car d'une part ils sont devenus des canaux d'intérêt, constituant la majorité des cibles thérapeutiques, et d'autre part ils ont servi de canaux modèles pour la validation de notre système (cf Chapitre 2).

Chez l'homme, parmi les 400 gènes qui codent pour des protéines canal, on en recense 170 spécifiques aux canaux potassiques [40]. Les canaux potassiques, qui laissent passer sélectivement les ions potassium, possèdent différentes fonctions incluant le maintien du potentiel de membrane au repos, la formation des potentiels d'action, la régulation du volume cellulaire et le contrôle de la sécrétion hormonale.

- A titre d'exemple, les canaux potassiques BK(Ca) voltage dépendants, de grande conductance, sensibles également au calcium sont des canaux rectifiants sortants. Ils sont impliqués dans différents mécanismes de la cellule tels que le contrôle du tonus artériel [41] ou encore la génération et la maintenance de l'hypertension [42]. Ces canaux sont sensibles à la Charybdotoxine (ChTX) et à l'Ibériotoxine (IbTX), deux toxines de venin de scorpion. Les canaux potassiques activés par le calcium et rectifiants sortants forment une classe majoritaire parmi les canaux impliqués dans la genèse du potentiel de membrane. La capacité de contrôle et de régulation du potentiel de repos de membrane est due à leur propriété de conduction atypique qu'est la rectification sortante. Dans la cellule, l'activation des canaux BK entraîne une augmentation du potassium intracellulaire, provoquant ainsi une inversion de potentiel de Nernst des ions K^+ vers une valeur plus positive [43].
- Les canaux IRK1 (Inward Rectifier K^+) sont eux des canaux potassiques voltage-dépendants rectifiants entrants. Ils sont ainsi impliqués dans la stabilisation du potentiel de membrane proche du potentiel d'équilibre pour les ions potassium. Ces canaux jouent un rôle important dans la régulation de l'excitabilité de certaines cellules cardiovasculaires et neurologiques [44]. Ils sont également fréquemment couplés à une protéine G et sensibles aux variations de concentration d'ATP intracellulaire.
- Le troisième et dernier type de canal que nous rencontrerons dans cette étude est le canal hERG (Human Ether a-go-go Related Gene). Il s'agit d'un canal potassique voltage dépendant rectifiant sortant. Le rôle de ce canal est bien connu dans la repolarisation du potentiel cardiaque [45].

Les canaux potassiques sont rapidement devenus des cibles privilégiées pour la recherche fondamentale et les industries pharmaceutiques pour quatre raisons principales [40]. Tout d'abord, les mutations naturelles sur les gènes codant pour les canaux potassiques sont connues pour causer des maladies. Par exemple, plusieurs mutations des canaux cardiaques hERG provoquent ce qu'on appelle le syndrome du QT long (cf paragraphe A.3.1 de ce Chapitre). Ensuite, il a été montré que l'absence de régulation de l'expression des canaux potassiques est liée à des états pathologiques. D'autre part, parce qu'ils tiennent un rôle important dans la régulation du potentiel de membrane, il est souvent intéressant de réguler des événements liés à la valeur du potentiel de membrane en intervenant de manière thérapeutique sur les fonctions des canaux potassiques. Enfin, plusieurs canaux potassiques cardiaques, comme les canaux hERG, sont devenus des cibles incontournables pour tester les effets secondaires de molécules thérapeutiques.

1.6. Techniques d'étude des canaux ioniques

L'implication des canaux dans un grand nombre de fonctions physiologiques est le fruit de la grande diversité de cette famille protéique. Plusieurs techniques ont donc été développées et permettent d'investiguer et d'étudier leur fonctionnement, en mesurant de manière indirecte ou directe les flux d'ions [46-48].

- Il existe tout d'abord les techniques de mesures basées sur la fluorescence. Elles ne mesurent pas directement le flux d'ions, mais le potentiel de membrane ou les modifications de concentrations ioniques, comme étant le résultat de flux ioniques. Ces mesures sont réalisées à l'aide de sondes fluorescentes (par exemple le Fura2 ou l'Indo1 pour le Calcium), dont l'émission de fluorescence est modifiée lors de leur liaison avec un ion spécifique. Ainsi les variations de potentiel de membrane ou de concentrations ioniques se traduisent par une variation globale de fluorescence.
- La technique de flux constitue une deuxième méthode de mesures de flux d'ions spécifiques. Cette technique se base sur l'utilisation de radio-isotopes des ions permettant de tracer le mouvement ionique. La cellule exprimant le canal ionique d'intérêt est incubée avec une solution contenant l'isotope, puis suite à la stimulation du canal, la mesure de la radioactivité intra ou extra cellulaire permet de déterminer les caractéristiques du flux d'ions. Cette technique est très utilisée dans le cas des canaux potassiques (le Potassium est alors remplacé par le Rubidium) ou des canaux non sélectifs des cations.
- Une troisième méthode, appelée technique de liaison, détecte l'interaction d'un composé avec le canal. Elle n'est pas considérée comme fonctionnelle car elle ne détermine pas l'action de ce composé sur le canal et nécessite l'utilisation d'un ligand connu, spécifique du canal étudié, auquel un marqueur radioactif est greffé. Cette technique donne fréquemment des faux négatifs, car la liaison du composé au canal ne garantit pas une modulation fonctionnelle, et nécessite l'emploi d'une méthode de mesure supplémentaire pour déterminer la nature du composé (agoniste ou antagoniste).
- Enfin la dernière technique mise au point est la technique du patch-clamp, qui permet de mesurer directement le courant généré par les flux d'ions. Cette technique a constitué la base de tout mon travail de thèse.

2. Le patch-clamp

Les prémices de l'électrophysiologie apparaissent aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles avec les travaux de Galvani (1737-1798), de Volta (1745-1827) et de Du Bois-Reymond (1818-1896) qui avaient permis de mettre en évidence « l'électricité animale » dans les nerfs et les muscles de grenouilles. Ils avaient déterminé l'existence d'un potentiel électrique entre les milieux intra et extracellulaire. Mais l'étude des canaux ioniques débute réellement avec Berstein, qui en 1902 propose son « hypothèse du potentiel de membrane ». Berstein émet l'hypothèse que la membrane des cellules au repos est sélectivement perméable aux ions K^+ ; il propose également l'idée que le potentiel de membrane, créé par la diffusion passive transmembranaire de ces ions, soit égal à leur potentiel d'équilibre ou potentiel de Nernst. Même si cette théorie est incomplète (on sait maintenant que lors du potentiel d'action, la membrane est plus perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} qu'aux ions K^+), les ions diffusent bien au travers de la membrane selon leur gradient électrochimique [49].

A partir de 1952, l'histoire des canaux ioniques prend un nouveau tournant quand Hodgkin et Huxley proposent une nouvelle interprétation. Grâce à leurs travaux sur l'axone géant de calmar, ils montrent que le potentiel de repos est effectivement proche du potentiel d'équilibre

pour l'ion potassium, mais que le potentiel d'action résulte d'une augmentation rapide et transitoire de la perméabilité au sodium suivie de la perméabilité au potassium.

C'est finalement en 1976 que la lumière sera faite sur les canaux ioniques. Neher et Sackman mettent au point une technique, le patch-clamp, qui leur permet pour la première fois d'enregistrer le courant traversant un seul canal [35, 38].

2.1. Principe et mise en oeuvre

Le patch clamp permet de mesurer les courants ioniques circulant au travers de la membrane cellulaire. Son principe consiste à isoler électriquement un morceau de membrane ("patch") et à lui imposer un potentiel ("clamp") afin de mesurer le courant généré par les flux d'ions [38, 50, 51]. Si son principe est simple, sa mise en œuvre est beaucoup plus complexe et requiert un équipement lourd ainsi qu'un manipulateur qualifié (Figure 5). Pratiquement, l'expérimentateur dispose des cellules dans une boîte de Pétri contenant une solution électrophysiologique extracellulaire, dite aussi solution extrapipette (solution saline conductrice et adaptée aux cellules). L'expérience de patch-clamp débute par l'étirement d'une pipette de verre. Pour cela on place un capillaire de verre (de 10 cm de long et de 1 mm de diamètre environ) dans une étireuse : au centre un filament de tungstène permet de chauffer le verre pendant que le capillaire est étiré par les deux extrémités. On obtient alors deux micropipettes identiques, de 5 cm de long environ et dont le diamètre à l'extrémité varie entre 2 et 5 μm pour la plupart des expériences de patch-clamp. En jouant sur les paramètres comme la température de chauffage du filament, les forces et les vitesses d'étirement, il est possible de faire varier les géométries des pointes de pipettes (pointes plus ou moins étirées, diamètres variant de 100 nm à 20 μm).

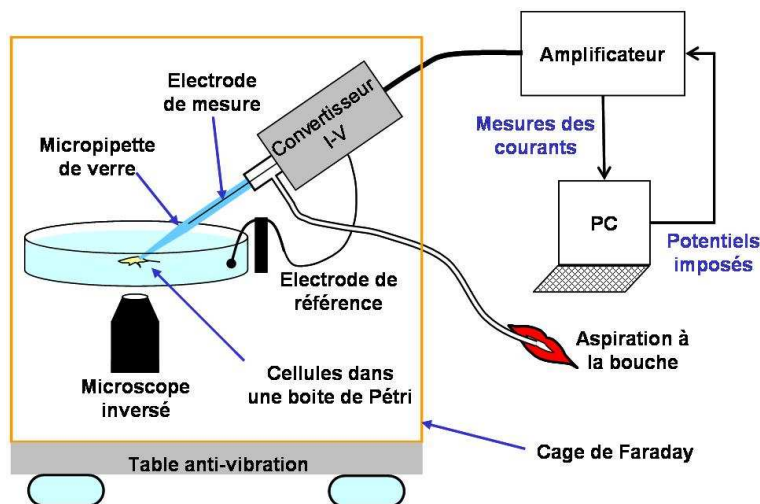


Figure 5 : schéma de principe d'un poste de patch-clamp.

La pipette est ensuite remplie de solution électrophysiologique (solution intrapipette). Elle est fixée sur une tête d'amplification (convertisseur I-V), elle-même fixée sur un micromanipulateur. Sous un microscope inversé, l'expérimentateur approche la pipette à l'aide de ce micromanipulateur, au contact de la cellule, puis aspire légèrement à la bouche afin que la membrane s'invagine de quelques microns dans la pipette (Figure 6).

Les courants mesurés étant de quelques pico-ampères, il faut minimiser le courant de fuite entre la pipette et le bain (milieu de conservation). L'obtention d'un fort scellement entre la membrane et la pipette de verre est donc l'étape déterminante pour la suite de l'expérience. Pour cela, tout en appliquant de brèves et faibles dépolarisations, on exerce une légère succion

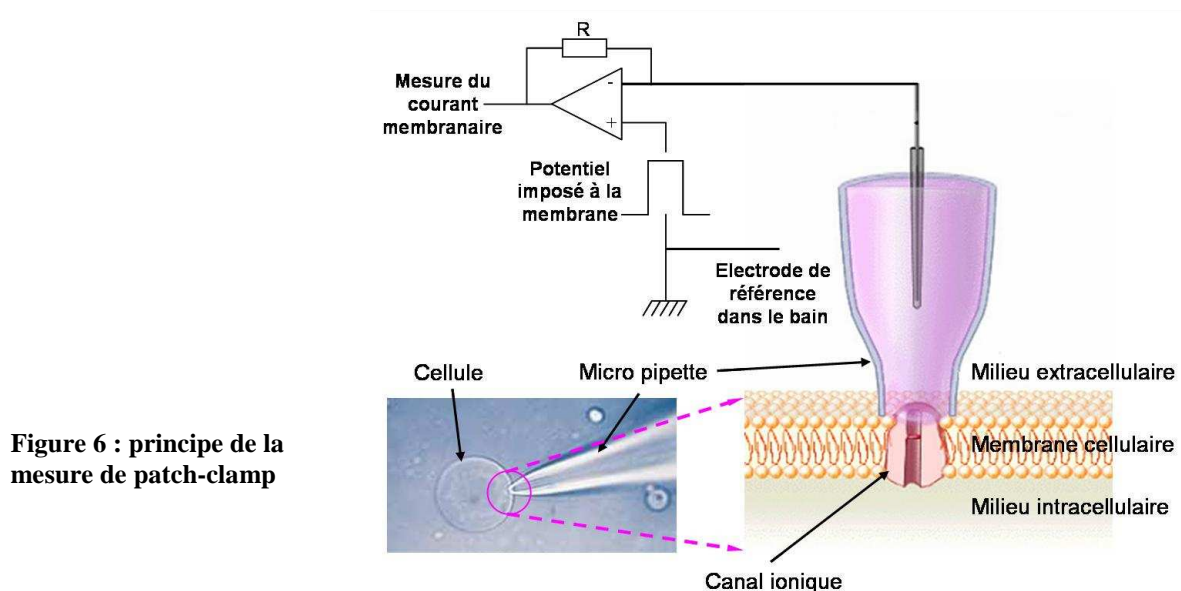
à la bouche (inférieure à 100 mbar) pour aider la cellule à se sceller au verre de la pipette. Un scellement, dont l'origine reste mal comprise, s'établit alors : on obtient ce que l'on appelle un giga-seal, c'est-à-dire un scellement dont la résistance dans les solutions électrophysiologiques classiques (dont la conductivité est de l'ordre 1 S/m) varie entre 1 et 20 GΩ en général.

Arrêtons-nous quelques instants sur la formation de ce scellement qui met en jeu des mécanismes physico-chimiques encore mal connus, mais certainement à l'échelle de la molécule. Sa qualité (sa résistance) dépend de l'état de la surface cellulaire, d'une géométrie bien définie de pipette, de facteurs comme la composition chimique du verre, les conditions d'étirement et le polissage à chaud de la pointe de la pipette [52]. Le scellement conditionne la stabilité mécanique de la liaison pipette-membrane et induit une forte barrière de diffusion des ions, ainsi que la formation de deux compartiments isolés dont on peut faire varier la composition ionique et chimique. De la qualité du scellement dépend aussi l'isolation électrique du morceau de membrane. Il détermine la bonne application d'un potentiel à la membrane et la mesure de très faibles courants résultants. Une partie du Chapitre 3 sera consacrée à l'optimisation du scellement de la cellule et traitera donc ce point plus en détail.

Un calcul simple permet de donner un ordre de grandeur de l'espacement entre la membrane cellulaire et le verre de la pipette lorsque le giga-seal est formé. Si l'on considère un diamètre interne de pipette de 2 μm, et que la membrane de la cellule s'invagine de 2 μm dans la pipette, on peut déterminer de manière simple l'ordre de grandeur de l'espace, e , entre la membrane et le verre lors de ce giga-seal :

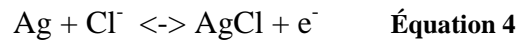
$$e \approx \rho \frac{l}{2\pi r R} \quad \text{Équation 3}$$

avec ρ résistivité de la solution (en Ω.m), r rayon interne de la pipette (en m), R résistance du scellement (en Ω), et l hauteur d'invagination de la membrane. On obtient alors un espacement de l'ordre de 1 à 2 Å [35, 53].



Une fois le giga-seal obtenu, la mesure des courants ioniques recherchés peut débuter. La Figure 6 permet de voir plus précisément le principe de la mesure de courant. On constate tout d'abord que des électrodes plongent dans la pipette (l'électrode de mesure) et dans le bain (l'électrode de référence, reliée à la masse). Ces électrodes sont dans la quasi-totalité des cas

des filaments d'argent chlorurés (avec de l'eau de javel pure) de manière à constituer une électrode Ag/AgCl. L'utilisation privilégiée de ce type d'électrode vient du fait qu'elles sont non polarisables. Les électrodes Ag/AgCl sont sélectives aux ions chlorure, présents dans les solutions électrophysiologiques; leur potentiel est fonction de l'activité des ions Cl⁻ dans la solution. La conversion des courants ioniques en courant électrique est régie par l'équation suivante :



La réaction est totalement réversible, aucune charge ne peut donc s'accumuler dans ces électrodes, elles ont donc un potentiel très stable, point essentiel pour le patch-clamp compte tenu de la durée d'une mesure électrique sur une cellule (en général entre 15 min et 1h) [54]. L'électrode de mesure est directement reliée à l'entrée négative d'un amplificateur opérationnel monté en contre réaction négative avec une résistance de gain variable. La tension de commande (potentiel imposé à la cellule) est, quant à elle, imposée par l'entrée positive. A l'issue de cet étage d'amplification, les courants de l'ordre du pA au nA sont convertis en tension de l'ordre du mV. Le signal, de nouveau amplifié en une tension 0-5V par l'amplificateur (Figure 5), est alors converti en un signal numérique par une carte d'acquisition, puis lu et enregistré sur un ordinateur.

Enfin deux installations sont inhérentes au poste de patch-clamp. La première est un cage de Faraday, dans laquelle toute l'instrumentation est disposée et soigneusement reliée à la masse. En effet tant que les signaux ne sont pas sous la forme d'une tension de l'ordre du mV, la moindre perturbation électromagnétique d'appareils extérieurs doit être évitée (néons, moteurs, écran de PC...). La deuxième est une table antivibration sur laquelle est déposée la cage de Faraday et tout ce qu'elle contient. Le scellement cellule/pipette est très fragile et les vibrations pourraient faire varier la tenue mécanique du scellement (et donc perturber la mesure) voire rompre totalement le scellement [54, 55].

2.2. Les types cellulaires couramment utilisés

Parce que les canaux ioniques sont présents à presque tous les niveaux des processus biologiques, leur étude s'effectue dans de nombreuses membranes cellulaires animales et végétales, des levures, des bactéries et même sur les membranes intracellulaires comme les mitochondries ou le noyau. Il est donc difficile de dresser la liste exhaustive de toutes les préparations qui font l'objet d'études électrophysiologiques par la technique du patch-clamp. Nous nous limiterons donc aux cas des cellules de mammifères et de l'ovocyte de Xénope (grenouille d'Afrique du Sud) et nous n'aborderons pas ici le cas de l'étude de cellules organisées en tissus (tranches organotypiques) [35].

Les techniques de biologie moléculaire sont actuellement mises à contribution afin d'introduire dans des systèmes hétérologues, des gènes codant pour les canaux ioniques d'intérêt. L'expression de ces canaux est alors artificielle car les canaux sont en surnombre par rapport aux canaux natifs de la cellule. L'ovocyte de Xénope (cellule de grosse taille de 0.8 mm de diamètre environ) est couramment utilisé pour l'expression hétérologue. Les œufs sont prélevés sur la grenouille et soumis à une microinjection d'ADNc ou d'ARNm à l'aide d'une micropipette dans le noyau ou le cytoplasme respectivement. Les ovocytes sont alors testés en patch-clamp une fois les canaux exprimés à la membrane, c'est-à-dire environ 48h après l'injection [49].

Des cellules de mammifères de taille plus conventionnelle (10 à 20 μm) sont utilisées également en transfection : CHO (*Chinese Hamster Ovary*), HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*), HeLa (cellules tumorales issues d'un carcinome du col utérin), Jurkat (lignée lymphocytaire T)...Des plasmides comportant le gène canal et en général aussi le gène codant pour une molécule fluorescente comme la GFP (*Green Fluorescent Protein*) sont injectés dans les cellules via un agent perméant qui leur permet de traverser la membrane plasmique. La cellule exprimant les canaux ioniques à étudier est alors fluorescente et le contrôle de la transfection se fait donc optiquement. Le rendement de ces transfections transitoires reste cependant assez faible (entre 30 et 60%). Il est donc également possible de créer des lignées cellulaires surexprimant un canal ionique de manière stable avec un rendement atteignant quasiment 100%. Pour ceci le gène codant pour la protéine canal est associé à un gène de résistance à un antibiotique. Cet antibiotique présent dans le milieu de culture cellulaire, permet ensuite d'éliminer toutes les cellules n'exprimant pas le canal. En 1 ou 2 mois, l'antibiotique permet de faire une sélection quasi-totale et on dispose d'une lignée stable exprimant le canal d'intérêt.

Dans toutes ces techniques, le canal d'intérêt ne se trouve pas dans son environnement natif, il est surexprimé dans les cellules qui jouent le rôle d'hôte, mais qui permettent de faciliter l'étude de la protéine canal [35, 49].

2.3. Configurations de mesure

Dans cette partie nous allons nous intéresser aux 4 configurations de mesures possibles en patch-clamp (Figure 7).

- a) La première configuration est la configuration cellule attachée (« cell-attached »). Cette configuration est obtenue directement une fois le giga-seal formé. C'est la seule configuration qui conserve l'intégrité du milieu intracellulaire et la valeur du potentiel de membrane et permet d'étudier et de conserver les mécanismes intracellulaires responsables de l'activité du canal étudié. Seul le courant issu des canaux contenus dans le morceau de membrane emprisonné est mesuré. Dans le cas d'une faible densité de canaux sur la membrane, on parvient à n'emprisonner que quelques canaux voire un canal unique et faire ce qui est communément appelé du « single-channel ». Ce type de mesure permet par exemple d'étudier la statistique d'ouverture des canaux.

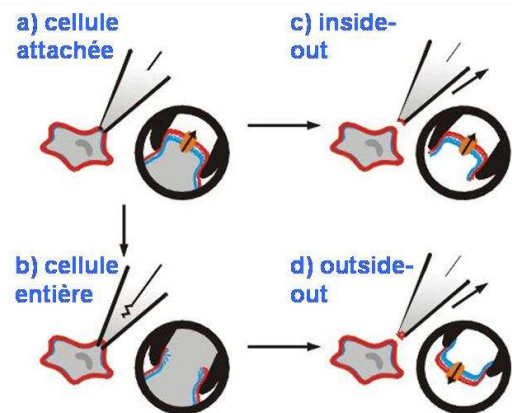


Figure 7 : les 4 configurations de patch-clamp accessibles avec une micropipette. Les configurations c et d sont appelées configurations excisées.

- b) A partir de la configuration cellule attachée, on parvient à la configuration cellule entière en déchirant le morceau de membrane invaginée ou en rendant la membrane perméable aux ions tout en conservant le giga-seal. Pour parvenir à ceci, il existe trois manières différentes :
- en aspirant de manière très brève et très forte.

- en appliquant un « Zap », c'est-à-dire un pulse de 1V sur une durée de 500 μ s à 5 ms dans la pipette. Des pores sont alors créés dans la membrane (on peut assimiler ceci à une électroporation localisée au niveau du morceau de membrane).
- en ajoutant dans le milieu pipette un antibiotique (amphotéricine, nystatine...) capable de créer des pores dans la couche bi-lipidique de la membrane. Cette digestion ménagée de la membrane permet de préserver le contenu intracellulaire.

Cette configuration cellule entière permet de mesurer les fluctuations du courant global ou du potentiel de membrane tout en contrôlant la composition ionique du milieu intracellulaire. En général, l'amplitude des courants mesurés varie entre 100 pA et quelques nA.

- c) La configuration excisée inside-out est obtenue à partir de la configuration cellule attachée. En retirant la pipette, le morceau de membrane est arraché, mais reste toujours scellé à la pipette. Le côté intracellulaire de la membrane se retrouve alors exposé au milieu extracellulaire qui peut être aisément manipulé. Cette configuration permet d'étudier de manière directe les canaux répondant à des stimuli intracellulaires (par exemple les canaux K_{ATP} sensibles à l'ATP intracellulaire).
- d) La dernière configuration est la configuration excisée outside-out. A partir de la configuration cellule attachée, la pipette est retirée (de la même manière que pour la configuration inside-out). En retirant la pipette, alors que la membrane de la cellule est toujours scellée à la pipette, une moitié de vésicule se forme et se sépare de la cellule. C'est alors la face externe de la membrane qui se retrouve orientée vers l'extérieur de la pipette. Cette configuration permet de manipuler l'environnement extérieur et notamment la concentration en neurotransmetteurs pour les récepteurs impliqués dans la neurotransmission.

Nous avons vu dans les paragraphes précédents l'existence d'un potentiel d'équilibre pour un ion donné. Le potentiel de membrane (V_m), qui dépend du potentiel d'équilibre (V_{eq}) et du potentiel imposé par l'expérimentateur (V_{cmd} , potentiel de commande) dans la pipette, se calcule donc différemment suivant les configurations de mesures :

en cellule attachée :	$V_m = V_{eq} - V_{cmd}$
en cellule entière :	$V_m = V_{cmd}$
en inside-out :	$V_m = - V_{cmd}$
en outside-out :	$V_m = V_{cmd}$

2.4. Principe de l'électronique de patch-clamp, circuit électrique équivalent de la cellule

Afin de décrire le principe d'une électronique de patch-clamp, il est tout d'abord nécessaire de considérer une cellule d'un point de vue électrique. La Figure 8 présente un canal, de

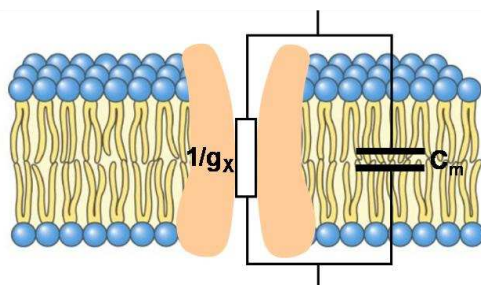


Figure 8 : schéma électrique équivalent d'un canal ionique ouvert inséré dans une membrane cellulaire. $1/g_x$ correspond à la résistance unitaire du canal pour l'espèce X de l'ion considéré.

conductance unitaire g_x , inséré dans un morceau de membrane cellulaire. Au cours d'un changement de potentiel de membrane, les ions circulent au travers du canal ouvert.

Toutefois ce changement de potentiel s'accompagne d'une accumulation de charges de part et d'autre de la bicouche lipidique. La membrane cellulaire, imperméable et isolante, entourée de deux milieux salins (intra et extracellulaire) forme alors une capacité que l'on nomme communément capacité membranaire de la cellule C_m . Cette capacité se trouve en parallèle avec la résistance R_{ion} .

La capacité formée par une bicouche lipidique de moins de 10 nm d'épaisseur vaut environ $1 \mu F/cm^2$. Pour une cellule de mammifère de 10 à 15 μm de diamètre, la membrane forme une capacité d'une dizaine de picroFarad.

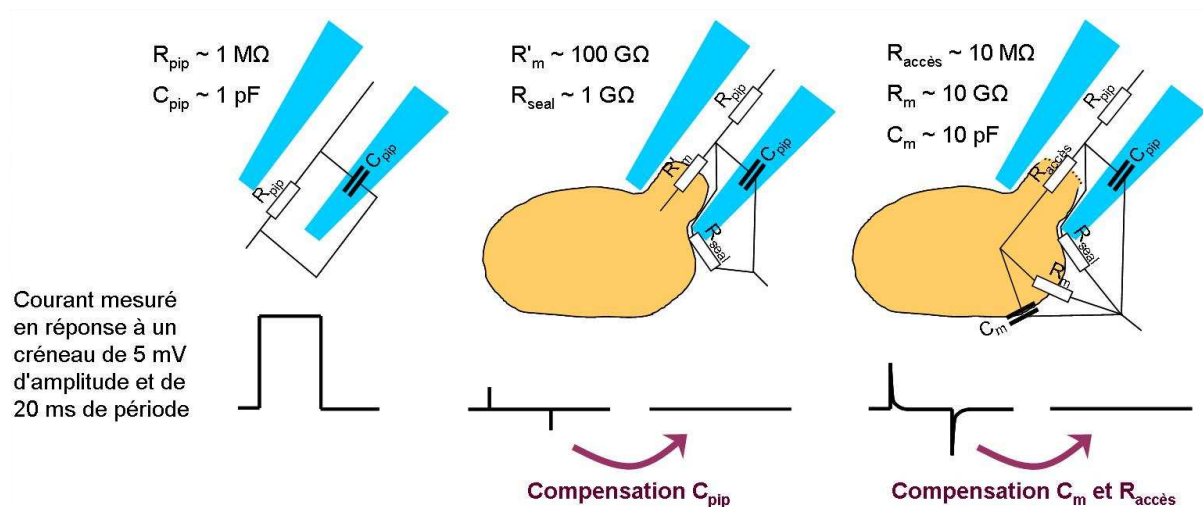


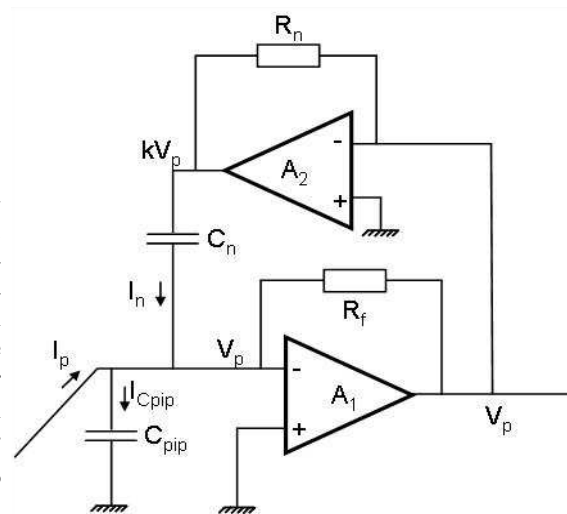
Figure 9 : schéma électrique équivalent relatif aux différentes étapes de formation du scellement jusqu'à la configuration cellule entière. A : pipette plongée dans le bain électrophysiologique. B : configuration cellule attachée. C : configuration cellule entière.

- Lors de l'expérience de patch-clamp, l'expérimentateur utilise une pipette de verre dont les caractéristiques électriques sont définies par une résistance R_{pip} (l'extrémité très étroite de la pipette constituant une résistance aux passages des ions) et une capacité C_{pip} en parallèle (le verre de la pipette, matériau isolant, est entouré de milieux salins conducteurs) (Figure 9 A). La réponse en courant à un pulse de potentiel, imposé dans la pipette par l'intermédiaire de l'électrode Ag/AgCl, correspond à une réponse typique d'un circuit RC parallèle. Toutefois, compte tenu des valeurs classiques de la R_{pip} et de C_{pip} , l'expérimentateur voit une réponse en courant qui est elle aussi un crénneau (le pic capacitif est masqué par l'amplitude du courant).

- En configuration cellule attachée (Figure 9 B), la résistance mesurée est celle du scellement R_{seal} (la résistance R'_m du morceau de membrane est de l'ordre de 100 $G\Omega$). Le circuit équivalent de cette configuration est alors le circuit R_{pip} en série avec R_{seal} et C_{pip} en parallèle. L'expérimentateur voit alors un signal quasiment « plat » à l'exception de pics capacitifs dus à la capacité de la pipette [35]. Il compense ce pic capacitif en faisant varier le gain d'un circuit de compensation comme décrit en Figure 10 [54, 56]. Ce circuit est monté en soustracteur du circuit d'amplification présenté dans le paragraphe 2.2 de ce chapitre, et

permet de soustraire l'effet capacitif de la pipette. A l'issue de cette étape on obtient un signal complètement « plat ».

Figure 10 : principe du circuit de compensation de la capacité de la pipette C_{pip} . L'amplificateur A_1 convertit le courant I_p en tension et l'amplifie grâce à la résistance variable R_f . L'amplificateur A_2 place la capacité de neutralisation C_n à un potentiel proportionnel à celui de la pipette V_p . En ajustant le gain k de l'amplificateur A_2 (en modifiant la valeur de la résistance R_n), le courant I_n devient égal à celui circulant à travers la capacité de pipette à compenser C_{pip} . La conservation des courants implique que I_p devient nul.



- Lors du passage en cellule entière la résistance mesurée est toujours R_{seal} , car la résistance de la membrane entière vaut environ 10 G Ω (Figure 9 C). On appelle également résistance d'accès $R_{accès}$, la résistance formée par les débris qui subsistent du morceau de membrane déchirée. En revanche, des pics capacitifs dus à la capacité membranaire de la cellule entière sont apparus sur le signal. Compte tenu des ordres de grandeurs des différentes composantes, le circuit équivalent de cette configuration est un circuit où $R_{accès}$ est en série avec R_{seal} et C_m en parallèle. Des circuits de compensation, sur le même schéma que celui de la capacité de pipette, sont disponibles dans le pré-amplificateur pour « corriger » les effets de ces composantes. Par ailleurs l'étape de compensation permet de déterminer la capacité de la membrane cellulaire et donc de caractériser l'aire de la membrane de manière simple et rapide (puisque la capacité est directement proportionnelle à l'aire de l'isolant). La densité d'un type de canal sur une cellule est relativement homogène, ainsi les courants ioniques sont souvent normalisés en fonction de la capacité de la cellule (en pA/pF) de manière à raisonner sur un même nombre de canaux à chaque fois.

2.5. Enregistrements de courants, exemples

Cette partie permet de rendre compte des ordres de grandeur et des temps d'activation des courants mesurés suivant les deux configurations cellule attachée et cellule entière dans le cas de canaux voltage-dépendants ou chemo-sensibles.

Sur la Figure 11, l'exemple d'enregistrement en configuration cellule attachée permet de voir l'activation de deux canaux voltage-dépendants dont les courants unitaires sont de l'ordre de 2.5 pA [57]. On constate également que l'ouverture et la fermeture des canaux sont très rapides, souvent inférieures à la milliseconde, fonctionnant selon un mode du « tout ou rien ». L'exemple d'enregistrement en mode cellule entière présente l'activation du récepteur GABA_A par un ligand spécifique [58]. Ici les courants mesurés sont de l'ordre du nA et l'on peut constater que l'activation du canal est instantanée à l'ajout du ligand.

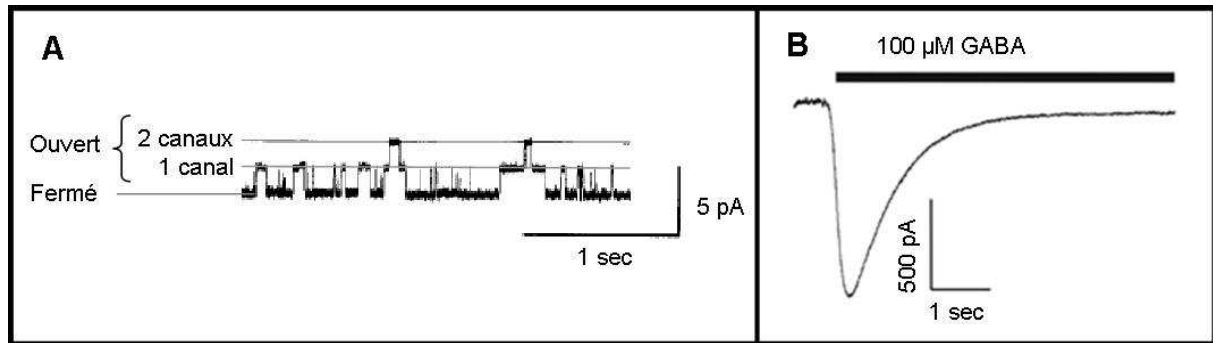


Figure 11 : exemples d'enregistrements de courants ioniques. A : enregistrement de courants du canal IRK1 (canal potassique) en cellule attachée sur un ovocyte de Xénope. B : enregistrement en cellule entière sur cellule HEK exprimant le récepteur GABA_A en réponse à 100 mM de GABA (gamma-amino butyric acid).

3. Le patch-clamp : un outil de la recherche pharmacologique

3.1. Implication des canaux ioniques dans les pathologies

En raison de l'hétérogénéité des canaux ioniques, leurs dysfonctionnements directs ou indirects sont associés à de nombreuses et diverses pathologies. Elles étaient partiellement connues par les cliniciens depuis des années mais c'est seulement la biologie moléculaire de ces dernières années qui a pu en expliquer la physiologie pathologique [59]. Cependant il est difficile de savoir si le dysfonctionnement de ces canaux est la cause ou la conséquence d'une pathologie cellulaire.

Certaines maladies des canaux ioniques sont associées à des désordres génétiques héréditaires. Les mutations des gènes codant pour les canaux ioniques affectent la fonction régulatrice des canaux. Ces pathologies sont appelées « canalopathies » et à ce jour, une trentaine ont été clairement identifiées et étudiées [60]. Citons quelques exemples de canalopathies connues et clairement identifiées en termes biologiques [49].

- **La mucoviscidose ou fibrose kystique** est une maladie héréditaire létale qui touche un nouveau né sur 2000. Le gène responsable de cette maladie fut découvert et cloné en 1989 [47]. Il code pour une protéine canal Cl⁻. La mutation du gène provoque une modification du fonctionnement de la protéine : les ions Cl⁻ ne sont plus sécrétés et les sécrétions d'ions Na⁺ et d'eau sont diminuées vers le compartiment muqueux. Les conséquences au niveau des poumons sont un épaississement du mucus et une inflammation chronique due au développement de bactéries pathogènes [59]. L'objectif des recherches pharmacologiques en cours est donc de corriger les défauts de transport des ions Cl⁻ et l'inhibition de l'influx d'ions Na⁺.
- **Les cardiopathies ou syndrome cardiaque du QT long** sont les pathologies cardiaques qui se définissent par un espace QT trop long. Cette anomalie est visible sur un électrocardiogramme. L'intervalle QT correspond au temps de systole ventriculaire qui va du début de l'excitation des ventricules jusqu'à la fin de leur relaxation. Cette durée anormalement longue du QT se retrouve dans divers syndromes comme les arythmies,

tachycardies, fibrillation ventriculaire...Ce dysfonctionnement est dû à un dérèglement dans la repolarisation du potentiel d'action ventriculaire, consécutif à diverses mutations de canaux potassium ou sodium. Trois canaux principaux sont ainsi en cause : KvLQT1, hERG et SCN5A [47].

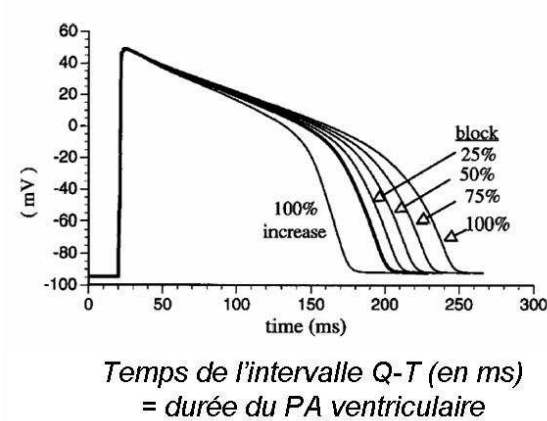


Figure 12 : Potentiel d'action (PA) dans les cellules musculaires du ventricule. La courbe en gras représente la durée du potentiel d'action à l'état naturel des cellules étudiées. En augmentant ou en bloquant le courant ioniques des canaux hERG, la durée du potentiel d'action peut être réduite ou allongée. La durée du potentiel d'action ventriculaire est reflétée par l'intervalle Q-T de l'électrocardiogramme.

Par ailleurs des QT anormalement longs peuvent aussi être la manifestation d'effets secondaires lors de la prise de médicaments. En effet certaines molécules utilisées dans la conception de médicaments ont pour effet le blocage des canaux hERG, le patient acquérant ainsi le syndrome du long QT (Figure 12, [61]). Lorsque l'intervalle QT devient trop long, le muscle ventriculaire n'est plus en mesure de répondre de façon uniforme aux battements, les cellules cardiaques se désynchronisent vers une activité électrique chaotique, une mort subite intervient. Du fait de leurs effets secondaires ayant entraîné la mort de patients, certains médicaments (neuroleptiques) ont été retirés de la vente [62]. Désormais, lors du cycle de développement d'un nouveau médicament (voir partie 2.6 de ce chapitre), les canaux hERG sont systématiquement utilisés comme sonde d'effets secondaires [63].

- **Les cancers** sont de plus en plus reliés aux canaux ioniques. La progression du cycle cellulaire dépend de la translocation d'ions à travers la membrane. Il a été observé dans plusieurs types cellulaires (poumons, vessie, prostate ou seins) une inhibition de la prolifération cellulaire lorsque des antagonistes de canaux potassiques sont appliqués. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, il a été montré que le contrôle de la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire dépendent de l'activité des canaux potassiques. Autre exemple, les canaux BK(Ca) sont cités dans plusieurs études traitant des cancers du sein [64-66], de l'activation des lymphocytes T [67] ou encore dans la prolifération de la rétinopathie [68]. Les canaux potassiques sont de plus en plus impliqués dans le phénomène de cancérisation et les activités de recherche dans ce domaine sont très importantes. Toutefois les canaux potassiques ne sont pas les seuls impliqués, les canaux calciques le sont également dans la prolifération cellulaire et l'apoptose.
- **L'épilepsie** se manifeste par des pertes d'attention et des convulsions graves et fréquentes. Plusieurs canaux cationiques, potassiques, sodiques et chlorites sont impliqués.

- Enfin citons l'**ostéoporose** qui touche principalement les femmes en causant des fractures osseuses et qui met en cause des canaux chlorites.

Par ailleurs, les canaux ioniques peuvent être liés de manière indirecte à des pathologies causées par un dysfonctionnement cellulaire et tissulaire tel que l'hyperexcitabilité des voies nerveuses ou l'altération de la conduction nerveuse. En d'autres termes, la pathologie provoque un dysfonctionnement des canaux, non pas en les altérant, mais en modifiant les paramètres physiologiques environnant qui permettent un fonctionnement normal de ceux-ci. Contrairement au cas des canalopathies, où les traitements sont curatifs, il est alors envisageable d'offrir un traitement palliatif agissant sur les canaux [47]. A titre d'exemple, nous pouvons citer le cas des maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, ou bien encore le cas de la sclérose en plaques. Dans cette dernière pathologie, on assiste à une atteinte évolutive du système nerveux central au cours de laquelle des plaques éparées de myéline (couverture protectrice des fibres nerveuses) de l'encéphale et de la moelle épinière sont détruites. Une des thérapies envisagées consisterait à utiliser des bloqueurs de canaux K^+ . En effet le blocage des canaux K^+ aurait pour effet d'augmenter la durée des potentiels d'actions et donc d'augmenter les courants locaux et ainsi d'améliorer la conduction entre les axones démyélinisés [49].

Les maladies liées aux canaux ioniques apparaissent ainsi sur les organes rénaux, endocriniens, osseux, neurologiques, cardiaques, musculaires... Etant donnée l'importance de ces protéines dans les processus physiologiques, force est de constater que leur implication dans les pathologies risque d'augmenter de manière significative dans l'avenir. L'exemple le plus probant est certainement celui des cancers, puisque de plus en plus de canaux ioniques sont soupçonnés ou semblent être impliqués dans les phénomènes de cancérisation.

La physiopathologie des « canalopathies » n'est souvent pas connue en détail car les canaux ioniques et leurs mutants doivent être étudiés par des techniques sensibles et élaborées, notamment par la technique du patch-clamp. En effet, les canaux ioniques, aisément accessibles par le milieu extracellulaire sur des cellules intactes, sont les seules protéines qui peuvent être observées en temps réel et de manière directe au niveau de molécule unique par la technique du patch-clamp. Les nouvelles découvertes en biologie moléculaire et l'étude de la structure-fonction des canaux ioniques par la technique du patch-clamp devraient permettre d'attribuer une thérapie à des maladies et de les traiter de manière plus ciblée et plus efficace.

3.2. Le patch-clamp dans le processus d'identification de molécules thérapeutiques

Le cycle de développement de nouvelles molécules thérapeutiques s'appuie tout d'abord sur les travaux de la recherche fondamentale qui ont pour but d'acquérir des connaissances sur la compréhension des fonctionnements biologiques et des dysfonctionnements pathologiques. Ces résultats identifient et valident le ou les canaux d'intérêts, appelés alors cibles thérapeutiques. Par la suite, un criblage d'une chimiothèque de molécules actives permet de sélectionner et de développer les molécules identifiées comme ayant un effet potentiellement intéressant sur un canal donné (Figure 13).

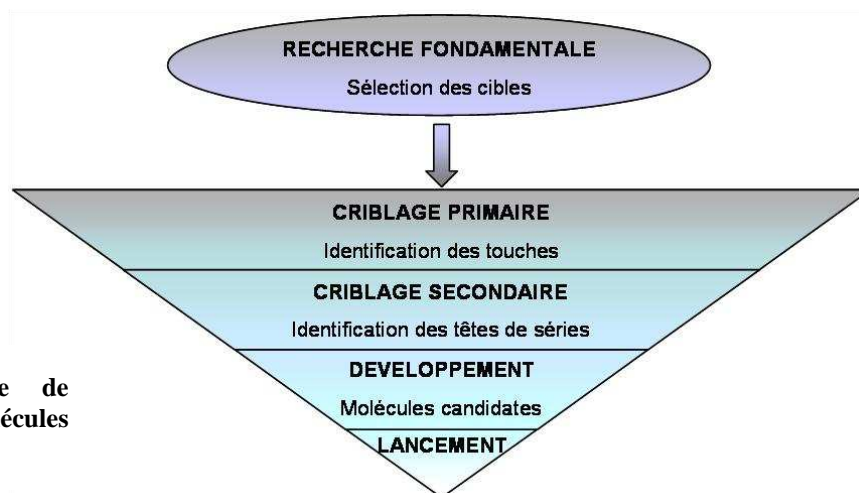


Figure 13 : le cycle de développement des molécules thérapeutiques.

Plus précisément, le premier criblage sert à l'identification de « touches ». Une grande collection d'entités chimiques est testée contre la cible identifiée par la recherche fondamentale. Les données obtenues servent à sélectionner les composés « touches », c'est à dire ceux qui présentent la meilleure interaction avec la cible. Le second criblage identifie les têtes de séries parmi les touches. Les composés sélectionnés précédemment sont étudiés pour leurs propriétés physiques et physiologiques. Ils sont également modifiés par chimie combinatoire pour optimiser leur mode d'action sur le canal d'intérêt. Le développement des molécules actives sélectionnées est ensuite divisé en deux phases, la phase pré-clinique puis la phase clinique, juste avant la mise sur le marché. Il existe une phase supplémentaire, appelée criblage toxicologique ou pharmaco-vigilance, qui permet de tester les effets secondaires éventuels des molécules sélectionnées sur des canaux ioniques dont le dysfonctionnement aurait des conséquences graves voire mortelles (cas des canaux hERG en particulier) [46, 69]. Au total, le cycle de mise sur le marché d'un médicament prend entre 10 et 15 ans.

Les canaux ioniques sont impliqués dans de nombreuses pathologies et pour les industries pharmaceutiques qui visent à découvrir et à valider des molécules innovantes les ciblant spécifiquement, leur étude constitue un défi majeur et un véritable goulet d'étranglement. Comme nous l'avons vu précédemment, seule la technique du patch-clamp permet d'étudier de façon directe les propriétés électriques de canaux ioniques individuels ou de récepteurs protéiques naturels ou recombinants. Aussi élégante et performante soit-elle, la technique du patch-clamp présente des inconvénients qui l'empêchent de révolutionner la recherche et le développement de nouveaux médicaments. Cette recherche et développement est réalisée selon une chaîne de valeurs dans laquelle les techniques employées doivent répondre à un certain nombre de critères comme la sensibilité, la sélectivité et la pertinence physiologique. L'élaboration de molécules d'intérêt thérapeutique ou le test de molécules issues de vastes chimiothèques requiert ce panel de techniques à différents stades. En d'autres termes, même les techniques indirectes (flux, liaison et fluorescence) vont être employées dans certaines phases de développement car elles suffiront à répondre à la question posée. La technique du patch-clamp, bien que la plus performante et la plus directe, souffre d'un trop faible débit (un « patcheur » expérimenté parvient à réaliser une vingtaine de mesures par jour en moyenne) pour pouvoir répondre aux besoins de tests, en particulier lors du criblage primaire, à moyen et haut débit de l'industrie pharmaceutique (Tableau 2) [47, 70].

	<i>Patch-clamp</i>	<i>Liaison</i>	<i>Flux</i>	<i>Fluorescence</i>
<i>Recherche fondamentale</i>	++	++	++	+
<i>Premier criblage</i>	-	++	++	++
<i>Second criblage</i>	++	-	++	++
<i>Criblage toxicologique</i>	++	-	+	++

Tableau 2 : Techniques d'études des canaux ioniques dans la chaîne de développement de molécules thérapeutiques. ++ : très employée, + : peu employée, - : non utilisée.

B/ Emergence de nouvelles technologies

1. Les promesses des microsystèmes : pourquoi automatiser et paralléliser les mesures de patch-clamp ?

Le développement de microsystèmes destinés à automatiser et paralléliser les mesures de patch-clamp devrait permettre d'envisager une réduction de certaines étapes du processus de R&D par une accélération du criblage, et de concilier le haut-débit et la qualité de l'information obtenue (Figure 14, inspirée de [69]). Outre une augmentation du nombre de mesures réalisées par jour, ces nouvelles technologies promettent d'apporter un gain en sensibilité, une meilleure reproductibilité et une diminution des volumes de molécules utilisées [69]. Ce dernier point constitue un point crucial pour l'industrie pharmaceutique, puisque les molécules testées lors des criblages sont issues de chimiothèques, contenant des millions de composés en faible quantité, qui constituent en quelque sorte "la richesse" de l'entreprise.

Depuis les années 2000, plusieurs équipes tentent de répondre à ces besoins. En effet il est désormais possible de mettre à profit tous les progrès en matière de micro-électronique, microfabrication et microfluidique pour tenter d'apporter de nouvelles solutions ou de nouvelles alternatives à la technique du patch-clamp. L'émergence de ces nouvelles technologies s'est faite selon deux directions privilégiées: l'enregistrement automatisé sur cellules avec des micropipettes traditionnelles et un nouveau format de patch-clamp, le patch-clamp sur puce.

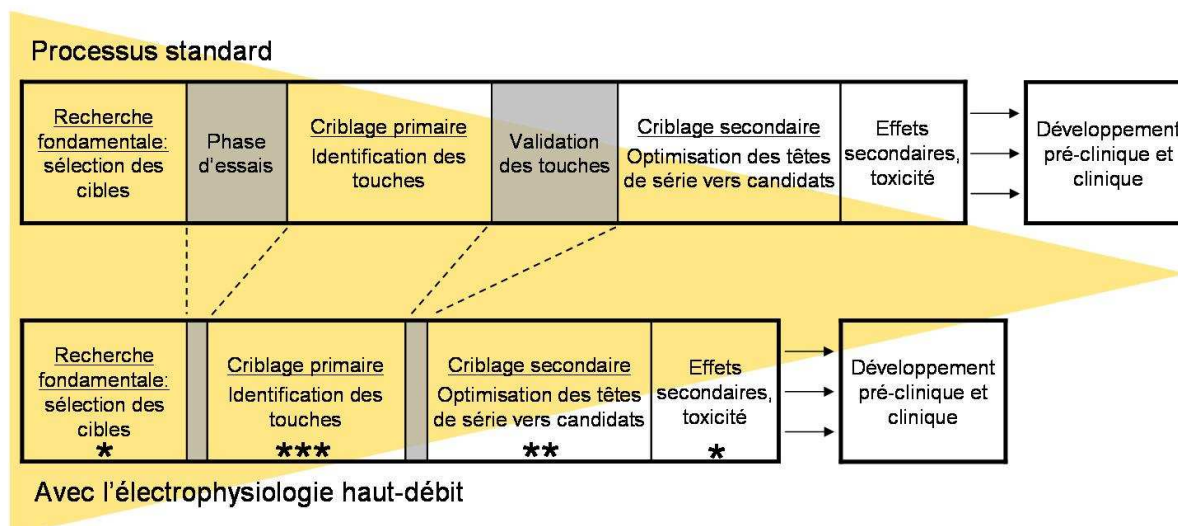


Figure 14: cycle de développement de molécules thérapeutiques ciblant les canaux ioniques. En haut le cycle standard, en bas l'impact attendu avec l'utilisation de l'électrophysiologie haut débit. Le nombre d'astérisques indique l'amélioration qualitative attendue pour chaque phase.

2. Enregistrements de courants cellulaires automatisés

Dans le but d'augmenter le débit des mesures de patch-clamp, les premières alternatives ont visé à développer des solutions autour des micropipettes de verre. Certaines équipes ont développé des automates utilisant les pipettes et d'autres se sont tournées vers la mise au point de puces microfluidiques facilitant les changements de fluides au niveau des cellules et réduisant les volumes consommés.

2.1. Automatisation basée sur l'utilisation de la pipette de verre

Le premier système automatisé apparaît dans les années 90. Il s'agit de conserver la configuration classique du patch-clamp et de contrôler informatiquement le positionnement de la pipette jusqu'au contact de la cellule (Figure 15 A). Si l'idée est très simple et presque naturelle, sa mise en œuvre l'est beaucoup moins. En effet le positionnement de la pipette requiert un programme informatique très fin, une reconnaissance automatique de la cellule, et une surface à la planéité contrôlée afin que la pipette de verre ne la heurte pas. L'automate ainsi développé présentait 8 sites de mesure parallèle pour un débit de 30 à 100 enregistrements par jour [71, 72].

Le deuxième système développé en Angleterre permet également de « patcher » des cellules de mammifères. Les concepteurs se sont affranchis d'un positionnement fastidieux de la pipette en proposant de patcher les cellules à une interface solution/air (Figure 15 B). Les cellules, dispensées dans un capillaire vertical, sédimentent à l'interface air/solution ; une micropipette, approchée en dessous, entre en contact avec une cellule de manière aléatoire. Ce système, qui est moins sensible aux vibrations que la méthode traditionnelle, offre un

rendement similaire au patch-clamp manuel. A ce jour aucun automate n'a été développé, la parallélisation des pipettes semble en effet complexe [46, 47, 71].

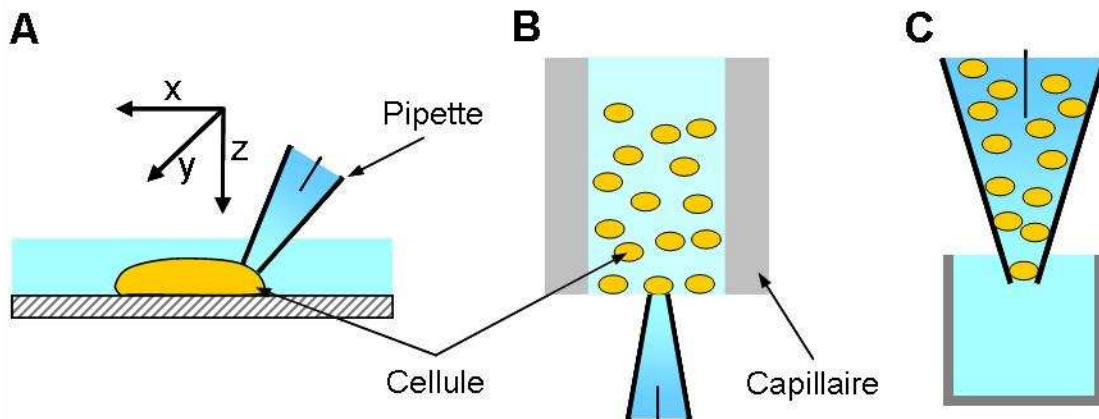


Figure 15 : schéma de principe des 3 principales approches pour l'automatisation des mesures de patch-clamp basées sur l'utilisation des micropipettes de verre. A : positionnement automatique de la pipette de verre. B : patch-clamp à l'interface air/solution. C : méthode développée par Flyion, les cellules sont injectées dans la pipette.

Enfin une troisième voie a été explorée par des Allemands de la société Flyon. Si la traditionnelle pipette a encore une fois été conservée, le concept est très novateur et surprenant. En effet le problème du positionnement de la pipette sur la cellule est contourné en introduisant les cellules dans la pipette et en réalisant le scellement à l'intérieur de la pointe (Figure 15 C). Cette approche a permis le développement d'un automate constitué de 8 électrodes en parallèle au format plaque 96 puits. Cet automate, disponible sur le marché, donne des résultats similaires à ceux du patch-clamp conventionnel [73].

2.2. Cartes micro fluidiques pour patch-clamp conventionnel

Les innovations concernent également l'environnement de la pipette de patch-clamp avec la création d'accessoires qui optimisent la mise en œuvre de la technique. L'exemple le plus abouti est la mise sur le marché, par la société Celectricon, de puces microfluidiques format « code barre » [74, 75]. La puce en PDMS (Poly-DiMéthylSiloxane) est composée de multiples microcanaux dans lesquels circulent des flux laminaires à haute vitesse de fluides d'intérêts (Figure 16).

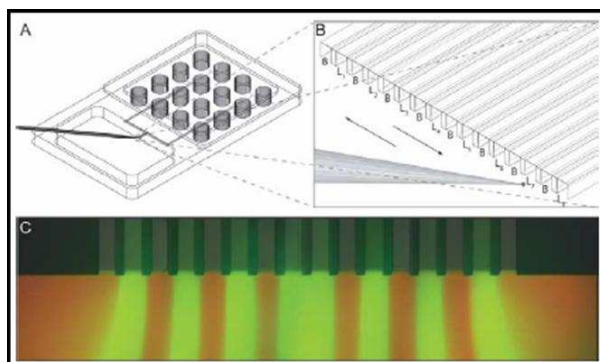


Figure 16 : principe de la carte microfluidique de Celectricon. A : vue générale de la puce où l'on distingue les 16 réservoirs pour drogues alimentant 16 canaux. B : une pipette de patch-clamp avec une cellule scellée est exposée au flux de liquide en sortie des canaux. C : photo en fluorescence montrant les flux laminaires en sortie des canaux.

Les composés multiples peuvent être dispensés sur la cellule patchée et le passage d'un composé à l'autre est très rapide (de l'ordre de la milliseconde). Cette technique, très bien adaptée à l'étude des canaux dont la désensibilisation est rapide, permet également de stabiliser le scellement de la cellule (grâce au flux laminaire de fluide sur la cellule) [76].

2.3. Limites de ces systèmes

Si l'approche de Celectricon démontre bien la valeur ajoutée que peuvent apporter les techniques de microfabrication au patch-clamp, elle est cependant très loin d'une possible automatisation. Elle semble être une alternative permettant d'augmenter la sensibilité de la mesure, plutôt qu'une solution pour miniaturiser et paralléliser la mesure des courants ioniques.

En ce qui concerne les techniques basées sur la mise en parallèle de micropipettes, seule une a abouti. Les deux premières se sont heurtées à la complexité du positionnement automatique de la pipette pour parvenir au contact de la cellule et qui plus est, à la parallélisation de ces systèmes de positionnement. Flyon a, en quelque sorte, révolutionné l'utilisation de la pipette et propose une réelle parallélisation de mesures. Néanmoins la fabrication de micropipettes de verre encapsulées dans un packaging en polymère semble être un frein majeur à cette technique originale. En effet, s'il est envisageable de produire un nombre moyen d'électrodes, une production à grande échelle et à faible coût semble compromise.

3. Patch-clamp planaire et transverse

La parallélisation et la miniaturisation du patch-clamp semblent limitées par la pièce maîtresse que cette technique requiert, la micropipette de verre. Depuis le début des années 90, les nouvelles technologies ont été utilisées pour développer des biopuces qui permettent aujourd'hui d'augmenter le rendement des tests biologiques. A l'instar d'une des premières applications développées [37], les puces ADN, les personnes s'intéressant au patch-clamp haut débit se sont naturellement inspirées des précédentes puces à protéines et puces à cellules développées. Depuis les années 2000, nous avons donc assisté à la conception et à l'utilisation de biopuces pour l'électrophysiologie haut débit et plus particulièrement pour la technique de patch-clamp. Si le principe de la mesure a été évidemment conservé, c'est sa mise en œuvre qui a dû être revue et corrigée afin d'être compatible avec les exigences du moyen et haut-débit.

3.1. Principe et historique du patch-clamp sur puce

Le patch-clamp sur puce est issu de la recherche académique internationale. L'idée de cette technique est d'utiliser un substrat plan (verre, PDMS, plastique ou silicium) percé d'un microtrou pour remplacer l'extrémité de la micropipette. Le format de la mesure est en quelque sorte inversé, puisque ce n'est plus la pipette qui est approchée au contact de la cellule, mais c'est la cellule qui vient se placer sur le microtrou (Figure 17). Pratiquement, les liquides électrophysiologiques sont dispensés de part et d'autre de la puce, puis une suspension cellulaire est injectée au niveau de la partie supérieure. Une des cellules est « capturée » sur le microtrou par aspiration où le scellement est réalisé de la même manière que dans la technique conventionnelle. On constate cependant que seules deux configurations

de mesures seront accessibles avec la technique du patch-clamp planaire : les configurations cellule attachée et cellule entière.

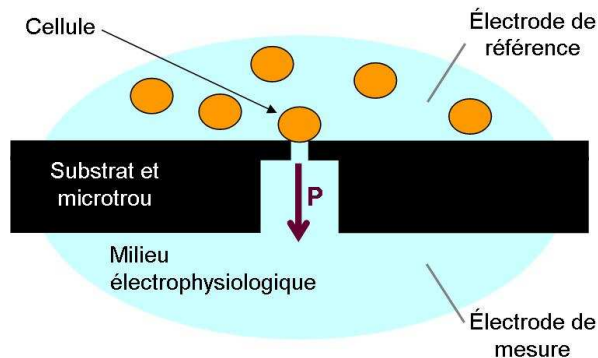


Figure 17 : schéma de principe de la mesure de patch-clamp sur puce (P : pression en mBar)

Parmi les perspectives de développement qu'offre ce nouveau format de patch-clamp figure tout d'abord la parallélisation des mesures. En effet, elle est aisément envisageable en fabriquant une puce comportant une ou plusieurs dizaines de trous et répond ainsi au besoin d'électrophysiologie moyen et haut débit formulé par les industries pharmaceutiques. Par ailleurs cette technique se démarque du patch-clamp conventionnel par deux atouts supplémentaires : le changement de milieu intrapipette est facilement réalisable et le scellement cellule-substrat est mécaniquement plus stable, puisque la cellule repose directement sur le microtrou (il est possible de s'affranchir de la table anti-vibration utilisée pour la technique conventionnelle) [33, 37].

On peut considérer que la faisabilité de cette nouvelle technique a été démontrée d'une part à Yale par l'équipe de Fred Sigworth, éminent électrophysiologiste et l'un des instigateurs de la technique du patch-clamp avec Sackmann et Neher, et d'autre part par l'équipe de Niels Fertig. Les premiers sont en effet parvenus à réaliser des mesures de courant sur des ovocytes de Xénope positionnés sur des microtrous de 8 μm de diamètre réalisés dans une puce en PDMS [77], les seconds ont choisi un substrat en borosilicate et des cellules de mammifère (CHO) pour montrer la faisabilité du patch-clamp planaire [78-80].

Ces démonstrations de concept sont alors devenues le point de départ d'une course technologique impliquant près d'une dizaine d'équipes internationales, appartenant aussi bien au monde de la recherche académique qu'aux leaders industriels de l'électrophysiologie.

3.2. Etat de l'art, présentation

Dans cette partie je présente les principaux acteurs du patch-clamp planaire, afin de montrer la diversité des voies empruntées, et de dresser un bilan des atouts et des inconvénients de chacune des solutions envisagées. Ceci nous permettra de comprendre en quoi le projet Multi-Patch du CEA peut se démarquer de tous ses concurrents.

- **Puces plastique/silice**

L'IonWorks, l'automate de la société Molecular Devices, est capable de réaliser 48 mesures en parallèle. Cette technologie se base sur une puce en plastique avec un revêtement SiO_2 , le site de mesure comporte un microtrou de 1 μm de diamètre environ. La PatchPlate (Figure 18), la puce dédiée à l'automate, contient 384 trous; la partie fluidique inférieure est commune à tous les trous, mais la fluidique supérieure est individuelle [81, 82].

Le principe de fonctionnement du robot est le suivant: la PatchPlate est positionnée sur le système, et un robot pipetteur (12 pipettes) remplit les puits ligne par ligne (solutions de mesure, suspension cellulaire). Pour la mesure, une tête contenant 2x24 pré-amplificateurs plonge les électrodes dans les chambres supérieures, la chambre inférieure ayant une électrode de masse commune. Ce robot effectue donc 48 mesures en parallèle, mais ne peut réaliser les mesures de courants et l'injection des drogues de manière simultanée, ce qui limite son utilisation aux canaux voltage-dépendants.

Récemment, pour palier aux faibles rendements de scellements cellules/substrats, Molecular Devices a conçu le IonWorks Quattro, un automate basé sur l'utilisation de puces comportant quatre microtrous par site de mesure. Des quadruplicates sont directement mesurés à partir d'un site de mesure (la mesure représente un courant moyen sur 4 cellules), augmentant ainsi le rendement de l'appareil et les tests statistiques [83].

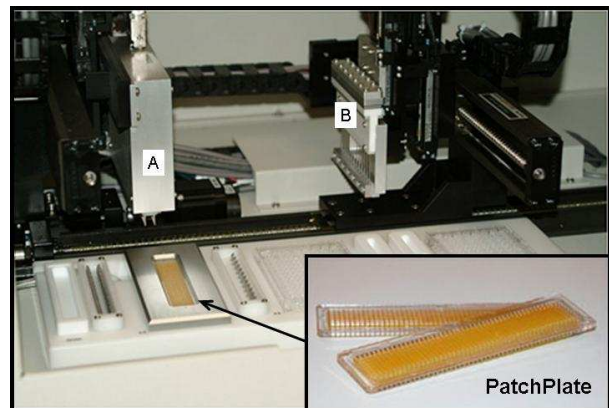


Figure 18 : photo de la PatchPlate de Molecular Devices et de l'intérieur de l'automate : en A il s'agit de la tête contenant les 48 pré-amplificateurs et en B de la tête du robot pipeteur (12 pipettes).

- **Barette patch-clamp en verre**

Axon a développé un robot capable d'effectuer 16 mesures en parallèle. Il fonctionne avec des puces en verre fabriquées par Aviva. La SealChip16 consiste en 16 trous de 1 μm (Figure 19), le réservoir supérieur contient entre 50 et 100 μL de solution.

La fluidique est réalisée par un dispenseur à pipette unique qui vient se placer au-dessus de la barrette et remplit chaque chambre supérieure. La mesure électrique se fait à l'aide de 16 amplificateurs (8 MultiClamp 700B munis de 2 voies chacun) disposés sous l'automate [84].

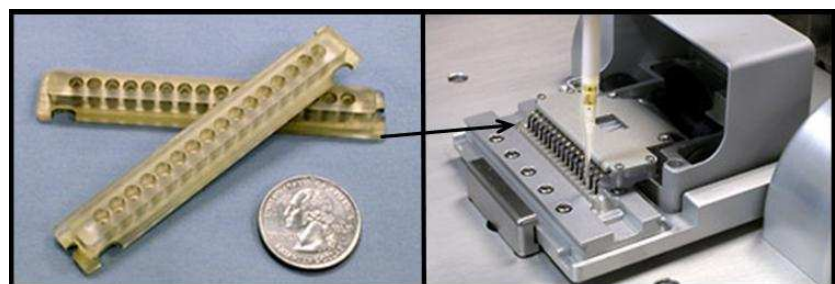


Figure 19 : photos de la puce Aviva, barette de 16 sites de mesure, et du cœur de l'automate Axon où elle est disposée

- **Puce silicium**

La station de patch de Sophion Bioscience est la plus intégrée du marché. Leurs puces sont en Silicium (avec un dépôt SiO_2 en surface) insérées dans une matrice en verre au format 96 et 384 trous formant ainsi la QPlate.

Sophion se démarque des deux précédents concurrents par une fluidique planaire intégrée qui permet une faible consommation des échantillons testés (volume de la chambre 2 à 5 μL). Le QPatch dispose également d'une électronique partiellement intégrée. Sophion a en effet

développé deux cartes avec 8 pré-amplificateurs, qui sont placées sous la QPlate, proches des électrodes. Ces cartes sont ensuite connectées à une carte "Digital Signal Processor (DSP)" qui permet les compensations rapides et le filtrage des données [72, 85]. Enfin la dernière originalité de cet automate est de disposer d'une petite plateforme de préparation et gestion des cellules avec un réservoir de conservation et une petite centrifugeuse.

- **Puce en borosilicate**

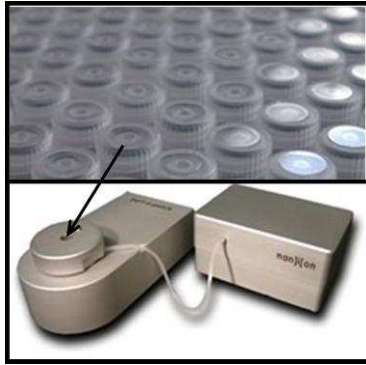


Figure 20 : photo des puces Nanion conditionnées dans leur « capsule » (en haut) et photo de station de travail pour une seule mesure (en bas).

La puce de Nanion est fabriquée en borosilicate, verre couramment utilisé pour la fabrication des pipettes de patch clamp [78, 79]. Dans un premier temps, cette start-up a développé un système planaire de mesure individuelle. Leur système est composé de "capsules" jetables qui sont insérées une à une dans une station (Figure 20). La mesure est réalisée par un amplificateur HEKA, et Nanion a conçu un boîtier permettant l'automatisation de l'aspiration [86, 87].

Nanion vient de transposer son système à un format 16 trous. Ce format leur permet entre autre de disposer d'une fluidique automatisée pour la dispense des cellules et de drogues, ce qui manque à leur format de puce unique.

Leur puce en verre est certainement une des plus sensibles du marché et offre des rendements de scellements de la cellule sur le microtrou les plus reproductibles.

- **Puce en quartz à deux ouvertures concentriques**

La technologie de Cytocentrics réside dans la conception d'une puce entièrement en quartz, matériau qui génère très peu de bruit électronique pour le patch clamp compte tenu de sa faible constante diélectrique. Cette puce contient deux ouvertures concentriques : un canal d'aspiration pour attirer les cellules et un canal de mesure (Figure 21); cette alternative permet de positionner la cellule sur le microtrou de manière très efficace [88]. Cytocentrics a récemment conçu un automate composé de 20 sites de mesures, mais qui demeure toujours en phase de validation interne.

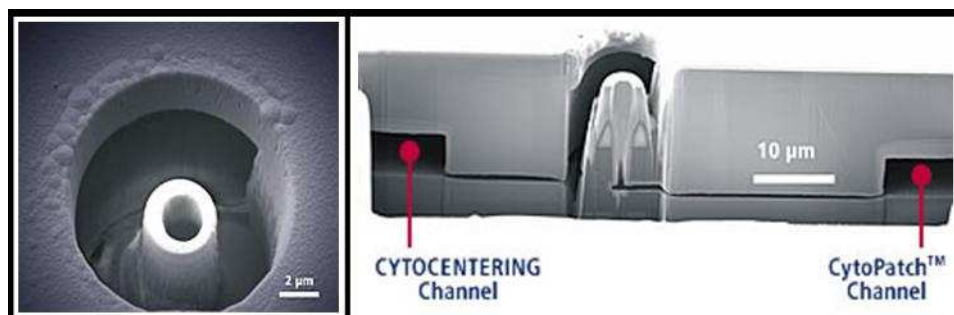


Figure 21 : photo de la puce de Cytocentrics (à gauche). Coupe d'un site de mesure (à droite) : on distingue deux canaux d'aspiration distincts, celui pour le positionnement de la cellule, et celui pour la mesure des courants.

- **Puce en polymère (PDMS)**

L'équipe de Fred Sigworth est pionnière dans le monde du patch-clamp planaire. Les chercheurs ont mis à profit les techniques de microstructuration du PDMS pour développer leur puce. C'est en 2002 que la preuve de faisabilité a été montrée avec des mesures de courant en cellule attachée sur des ovocytes de Xénope disposés au-dessus d'un trou de 8 μm [77]. La validation sur des petites cellules de mammifère (type CHO) a été réalisée quelques années plus tard, la limite étant essentiellement technologique (difficile de réaliser des trous de 2 μm de diamètre dans une puce entièrement en PDMS) [89, 90].

- **Puce PDMS au format transverse**

L'équipe du professeur Luke Lee à Berkeley s'est appuyée sur les travaux de Sigworth qui avaient montré que le scellement de la cellule sur un substrat de PDMS était possible. Elle s'est ensuite dirigée vers un concept original et intéressant : le patch-clamp transversal (Figure 22) [91].

L'idée est de créer des microcanaux dans une plaque de PDMS. Le microtrou est ensuite formé par la jonction de ces microcanaux avec une plaque de verre. Ce format définit des microtrous semi-circulaires qui permettent néanmoins d'obtenir des résistances de scellement importantes. La puce développée permet de limiter les volumes utilisés et de réduire les couplages capacitifs entre le canal et la chambre fluide commune [92].

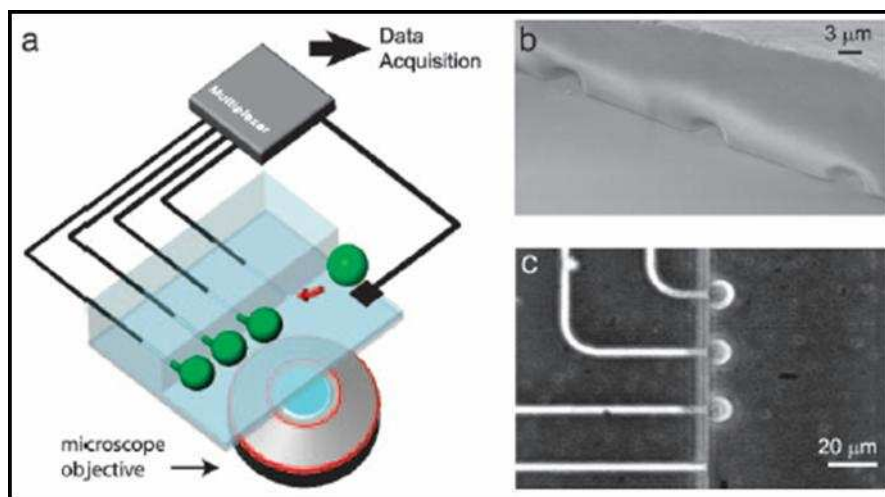


Figure 22 : principe de la puce patch-clamp transverse. a : vue d'ensemble du système avec 4 microcanaux. b : vue MEB de 3 microtrous formés par l'assemblage de la plaque de PDMS dans laquelle les canaux sont structurés avec une plaque de verre. c : observation microscope de 3 cellules capturées par aspiration .

3.3. Verrous technologiques

Travaillant sur le même sujet et avec un objectif commun, les différentes équipes impliquées dans cette course à l'électrophysiologie haut-débit ont développé des solutions très diverses et variées, de par les matériaux utilisés, les formats de puces, les procédés de dispenses de fluides ou encore les modes de mesure électronique. Si différentes soient-elles, toutes ces

approches se sont heurtées et se heurtent encore actuellement à des verrous technologiques inhérents à la parallélisation des mesures de patch-clamp sur un substrat plan [37].

- **Positionnement de la cellule sur le microtrou**

La technique planaire impose d'attirer, parfois sans contrôle optique possible, une cellule unique de la suspension cellulaire sur le microtrou. Ce point s'avère bloquant et requiert un certain « doigté » pour le maîtriser. En effet, il s'agit de capturer et de sceller, par aspiration, une cellule unique sur le microtrou. Le contrôle du positionnement de la cellule ne peut se faire qu'en mesurant l'évolution de la résistance du microtrou. La majorité des équipes a proposé d'attirer la cellule par aspiration. La solution de capturer la cellule par un flux électrophorétique a été proposée par Schmidt *et al* [93] mais n'a pu être validée que sur des vésicules et non sur des cellules.

- **Interaction cellule/substrat**

Le mécanisme d'interaction de la cellule avec le verre de la micropipette étant non élucidé, les acteurs du patch-clamp planaire ont été contraints de concevoir des puces de manière empirique en s'appuyant sur les constatations des « patcheurs » conventionnels quant au type de verre à utiliser pour fabriquer les micropipettes ou encore quant à la forme de la pointe. Une question rédhibitoire surgit : quel matériau choisir pour la conception des puces afin d'offrir un scellement cellule-substrat stable et très résistif ? Doit-on inévitablement utiliser le verre et même plus précisément le borosilicate ou le quartz [37]? Certaines équipes ont répondu oui à cette dernière question car elles maîtrisaient les techniques communes de microstructuration du verre ou encore car elles ne voulaient pas que ce point soit un frein à un développement rapide. Les autres équipes se sont tournées vers des matériaux comme le plastique, le PDMS ou le Silicium qui possèdent des propriétés intéressantes, comme le coût, la flexibilité et les intégrations possibles de fonctions actives (comme la diélectrophorèse, l'électronique) pour le silicium notamment.

Par ailleurs, la qualité de la suspension cellulaire est primordiale. En effet, l'aptitude des cellules à sceller dépend aussi bien du mode de décollement des cellules dans les boîtes de culture que du mode de conservation pendant l'expérience. L'objectif est de disposer d'une suspension de cellules viables, de taille homogène et ne se regroupant pas en agrégats à une concentration optimale pendant tout le temps de l'expérience.

Le Chapitre 3 est consacré à l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes de scellement cellule/substrat.

- **Parallélisation de l'électronique de mesure**

Comme nous l'avons évoqué dans la première partie de ce chapitre, l'électronique de patch-clamp est une électronique sensible et très complexe qui requiert des circuits de compensation de capacités, de résistances et de potentiels. Ainsi, la parallélisation envisagée avec le patch-clamp planaire nécessite un multiplexage de l'électronique qui, pour des raisons de sensibilité, ne peut en aucun cas s'effectuer en amont de la pré-amplification. Sophion Bioscience et Molecular Devices ont ainsi développé des têtes de pré-amplification 48 voies pour 48 mesures en parallèle, alors qu'Axon a choisi de simplement multiplier le nombre d'amplificateurs électrophysiologiques conventionnels nécessaires pour effectuer 16 mesures. Ce n'est en fait pas tant le grand nombre de voies de préamplification qui constitue un verrou technologique, mais plutôt la conception de circuits électroniques et de logiciels spécifiques à l'électrophysiologie (incluant tous les modèles analogiques et numériques de compensation) qui sont le fruit de plusieurs années de recherche.

- **Parallélisation de la fluidique**

Ce point bloquant n'est pas propre à l'électrophysiologie planaire, ce problème se rencontre de manière récurrente dans le domaine des biopuces et « laboratoires sur puces » où une circulation de fluides est nécessaire sur plusieurs sites en parallèle de manière indépendante. La solution « idéale » n'existe pas à ce jour, et la gestion de la fluidique constituera certainement la barrière la plus difficile à franchir pour le développement d'un automate permettant des centaines de mesures simultanées. Pour l'instant, les différentes équipes ont développé des approches basées sur l'utilisation de robots pipetteurs dispensant les fluides site par site (ou 8 par 8 dans le meilleur des cas).

- **L'adsorption des toxines et des drogues**

Le problème de l'adsorption des drogues sur les matériaux n'avait pas été identifié avant l'apparition de la technique planaire. Ce n'est qu'avec les tests pharmacologiques réalisés sur les premiers automates que l'adsorption des drogues est devenue le point faible des nouveaux systèmes planaires. Les molécules testées sur les canaux ioniques sont dans la majorité des cas très hydrophobes et s'adsorbent à la surface des matériaux, plastiques et polymères principalement, utilisés dans le chemin fluidique de l'automate. Malgré les rinçages abondants, les matériaux relarguent une partie des composés utilisés dans les expériences antérieures et les résultats obtenus sont erronés. On constate que les IC50 (concentration à laquelle une drogue bloque la moitié des canaux ioniques sur une cellule) issues de mesures en patch-clamp planaire sont différentes de celles obtenues en patch-clamp conventionnel [94]. Il faut donc veiller à utiliser des matériaux inertes, ne relarguant pas ou peu de composés hydrophobes, comme le verre ou des polymères comme le PEEK.

- **La capacité des substrats**

Le paragraphe 2.5 de la partie A de ce chapitre a traité des valeurs de capacités courantes en patch-clamp. La micropipette de verre ayant une capacité faible (~ 1 pF) devant celle de la cellule (~ 10 pF), il est possible de détecter le passage en cellule entière grâce à l'apparition d'un pic capacitif spécifique dans le signal. La compensation de la capacité cellulaire permet ensuite de renseigner la taille de la cellule et donc de normaliser le courant mesuré. En patch-clamp planaire, contrairement aux substrats de verre et polymère qui ont des capacités environ égales à celle de la pipette, les substrats en silicium présentent de fortes capacités. Ces capacités sont inhérentes à la structure de la puce, constituée d'un cœur en Silicium, matériau semi-conducteur, recouvert d'une fine couche d'oxyde isolant. La puce disposée entre deux fluides salins conducteurs forme ainsi une capacité importante (souvent de l'ordre de la centaine de picoFarad) qui doit être diminuée de manière à ne pas masquer le passage en cellule entière. Par ailleurs les systèmes fortement capacitifs sont sources de bruit électronique, qui est ensuite amplifié dans l'électronique de mesure. Il faut porter une attention particulière à la valeur de la capacité de la puce lors de sa conception. A titre d'exemple, la société Sophion Biosciences est parvenue à réaliser une puce ayant une capacité de 50 pF environ au niveau du site de mesure [85].

4. Présentation du projet de recherche

Le Laboratoire Biopuces et le LETI, du CEA Grenoble, se sont lancés dans la course du patch-clamp planaire au cours de l'année 2002 avec le projet MultiPatch. Très naturellement le choix des substrats s'est tourné vers le plastique et le silicium car le LETI possède les compétences pour la microfabrication de ces matériaux. Toutefois, le plastique a rapidement été écarté du fait de la faible reproductibilité de la fabrication des microtrous sur les substrats.

Outre la maîtrise des procédés de microfabrication et la reproductibilité des motifs microstructurés, le Silicium offre des possibilités très diverses de dépôts, de fonctionnalisations de surfaces, de modification des propriétés intrinsèques (dopage) et présente des valeurs ajoutées telles que l'intégration de l'électronique ou l'ajout de fonctions actives comme des électrodes de mesure in-situ ou de diélectrophorèse intégrées, ou encore une dispense fluide par électromouillage. A elles seules, ces perspectives font du silicium un candidat plus qu'intéressant et incontournable pour les futurs systèmes de patch-clamp planaire. Ma thèse s'est inscrite dans ce contexte de recherche et de développement d'un système de patch-clamp planaire basé sur l'utilisation d'une puce en silicium. Je me suis plus particulièrement intéressé à la conception et la caractérisation de la puce en silicium. Mon travail a consisté à concevoir, développer et valider les briques de bases technologiques et biologiques nécessaires à la mise en œuvre manuelle et automatisée de la puce. Ces briques de bases autour desquelles s'articule mon manuscrit sont au nombre de trois et constituent en quelque sorte les recommandations pour les évolutions à venir du système : réalisation d'un système modulaire et flexible de mise en œuvre de la puce, optimisation du scellement de la cellule sur le microtrou et réduction de la capacité des puces silicium.

• **Preuve de concept : assemblage modulaire**

La validation du microsystème a constitué la première étape de mes travaux. Nous avons conçu un système d'assemblage modulaire et réversible, c'est-à-dire sans collage, flexible, évolutif et adaptable à différents types de puces. L'assemblage « sandwich » que nous avons fabriqué est constitué d'un « empilement » de différents modules, dont la puce en Silicium, maintenus entre eux par un système de serrage. Ce microsystème permet de tester des puces de géométries différentes sans jamais modifier les divers modules de l'assemblage. Ce système a permis de mettre au point des protocoles de remplissage du circuit fluide, d'aspiration et de capture des cellules et de mesures de courants potassiques sur des lignées cellulaires surexprimant des canaux BK(Ca) et IRK1.

• **Amélioration des performances du système**

Optimisation de l'interaction cellule/microtrou

La preuve de concept apportée, j'ai concentré mes efforts sur l'optimisation des performances de la puce. C'est ainsi que l'interaction cellule-microtrou a constitué le cœur de mon travail. Afin que la puce offre un rendement de « gigaseals » au moins égal à ceux du patch-clamp conventionnel, nous avons optimisé d'une part la qualité de la suspension cellulaire et d'autre part les caractéristiques des puces. Nous avons mené une étude systématique de l'influence des différents paramètres de la puce sur la qualité du scellement de la cellule. La mise en place d'un plan d'expérience et des caractérisations systématiques des puces, a permis de concevoir une puce « optimale » offrant un rendement de « gigaseals » important, et de discriminer les paramètres influençant la qualité du scellement. Cette approche par plan d'expérience est originale et n'a pas, à ce jour, été envisagée dans le domaine du patch-clamp planaire.

Amélioration des performances de la puce

En parallèle de l'amélioration de l'interaction cellule/microtrou, je me suis penché sur l'inconvénient majeur des puces en silicium, leur capacité intrinsèque. En patch-clamp les capacités sont sources de bruits externes (perturbations du 50Hz) et de bruits internes (bruit des composants électroniques). Une configuration particulière du système a permis de diminuer la capacité de nos puces silicium afin d'augmenter la sensibilité du système de

mesure. La capacité de la puce en silicium est désormais suffisamment faible pour pouvoir mesurer précisément la capacité de la membrane des cellules scellées sur les microtrous.

Validations électrophysiologiques

Les améliorations apportées sur l'ensemble des performances de la puce ont été mises en évidence par de nouvelles validations électrophysiologiques. Les canaux ioniques choisis pour ces études sont des canaux voltage-dépendants comme les canaux IRK1, hERG et des canaux BK(Ca) dont l'expression est inductible. Ces différents enregistrements, constitués de courbes d'activation et d'inhibition, de courbes dose réponse, démontrent la fiabilité et la robustesse du système.

• Prémisses d'une automatisation et applications parallèles

Le système que j'ai développé au laboratoire constitue un premier démonstrateur, dont la mise en œuvre reste manuelle et séquentielle. Afin d'exploiter pleinement les performances de la puce en silicium, j'ai initié le développement et la conception d'un automate en partenariat avec la société Bertin Technologies.

Par ailleurs, j'ai pu mener des actions ponctuelles et parallèles en m'impliquant dans d'autres projets du laboratoire Biopuces s'intéressant à la mesure des courants faibles. En effet, l'aspect modulaire de notre assemblage permet, en ne modifiant que la puce en silicium, de mettre à profit le système Multi-Patch dans des mesures de courant à travers des bicouches lipidiques ou des membranes artificielles en silicium ou encore dans la détection et le comptage de particules uniques au travers un microtrou.

Chapitre 2 : Conception et développement du démonstrateur Multi-Patch

A. Un assemblage sandwich modulaire

1. Introduction

Au commencement du projet, l'état de l'art sur le patch-clamp planaire était encore très succinct, seules quelques publications faisaient l'objet de la faisabilité et de l'intérêt de cette technique. La première inconnue restait le comportement des cellules sur un microtrou, et en particulier la faisabilité du scellement cellule/substrat sur une surface plane autre que le verre. Outre ses propriétés attrayantes (cf chapitre 1) nous avons choisi le silicium aussi pour des raisons de maîtrise de procédé, de reproductibilité et de coût. Nous avons donc développé une puce en silicium recouverte d'oxyde en s'appuyant sur le seul état de l'art existant : celui des observations empiriques sur les paramètres primordiaux des pipettes de verre pour parvenir à réaliser des scellements très résistifs. La transposition de ces règles relatives au patch-clamp conventionnel vers un format planaire n'étant pas évidente, nous avons décidé de mettre au point un assemblage flexible et modulaire pour tester un grand nombre de puces différentes. Nous avons également souhaité concevoir un système disposant de plusieurs sites de mesures indépendants fluidiquement et électriquement lors d'un même montage.

L'objectif final du projet est de concevoir un automate de patch-clamp planaire basé sur l'utilisation d'une puce en silicium, et permettant de réaliser des mesures indépendantes de manière parallèle et automatique. Ceci requiert le développement d'une électronique de mesure spécifique multivoies et d'une parallélisation de la microfluidique. Mon travail, qui se situe en amont de cet objectif final, consiste en l'optimisation de la puce. Afin de concentrer les efforts sur le développement de la puce, nous avons choisi de travailler de manière séquentielle et manuelle. Tout au long de cette étude j'ai donc réalisé les mesures site par site avec une gestion manuelle des fluides, en utilisant un amplificateur de patch-clamp commercial.

2. Puce en Silicium

2.1. Présentation de la puce

2.1.1. Structure générale

Les puces Mutli-Patch sont fabriquées à partir de plaques de Silicium de 100 mm de diamètre et de 450 μm d'épaisseur, polies double face [95] (article en Annexe 4). Cette taille de plaque permet de réaliser 12 puces de 20 x 20 mm² (Figure 23 A), dimension permettant une manipulation aisée de la puce avec une pince (Figure 23 B). Comme nous l'avons évoqué précédemment, la puce doit être disposée au centre d'un assemblage par l'expérimentateur, puis pressée entre les modules inférieur et supérieur, sans risque de se briser, afin de créer des compartiments fluidiques étanches et indépendants. De plus, afin de laisser un espace confortable entre chaque microtrou de la puce pour utiliser une grande variété de joints ou encore disposer les solutions dans les sites de mesures manuellement, nous avons réduit l'encombrement et disposé 9 sites de mesure par puce (Figure 23 A et B).

Par ailleurs, des solutions salines conductrices sont disposées de part et d'autre de la puce, et la conduction entre les étages inférieur et supérieur ne doit se faire que par le microtrou. Le

silicium étant un matériau semi-conducteur, ceci implique que la puce soit entièrement recouverte d'une couche d'isolant. Dans notre cas, sur les deux faces de la puce, cette couche d'isolant, de 2 μm d'épaisseur environ, est constituée d'un oxyde de silicium comme SiO_2 ou Si_3N_4 .

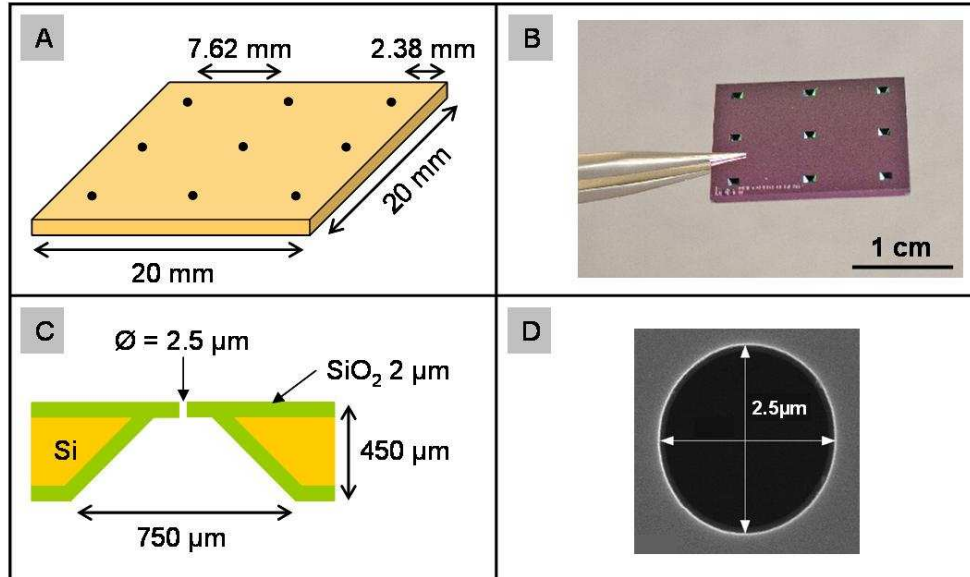


Figure 23 : structure de la puce en silicium. A : schéma de la puce comportant 9 microtrous (identifiés par 9 points noirs). B : photo de la face arrière de la puce où l'on distingue les 9 gravures KOH. C : coupe de la puce au niveau d'un site de mesure. D : photo MEB d'un microtrou.

Du côté inférieur de la puce, une gravure humide (KOH) permet de réaliser un accès du fluide vers le microtrou qui est gravé dans la couche d'oxyde supérieure (Figure 23 C et D). Ainsi à ce niveau, la couche d'oxyde forme une membrane suspendue de 2 μm d'épaisseur sur 30 x 30 μm^2 environ (le terme membrane sera utilisé plusieurs fois dans le manuscrit).

2.1.2. Dimension du microtrou

Le point critique dans la conception de la puce concerne les caractéristiques du microtrou et de la surface, puisqu'elles conditionnent la qualité et la stabilité du scellement de la membrane cellulaire. De 1976, année de l'invention de la technique du patch-clamp, à nos jours, les micropipettes ont fait l'objet de quelques études empiriques dressant en quelques sortes les caractéristiques optimales (type de verre, diamètre, épaisseur du verre à l'extrémité, forme de la pointe...) pour obtenir des scellements très résistifs de manière reproductible [96, 97]. Cependant il est très difficile de définir un type de pipette idéal, puisqu'à la lecture de ces références, on constate que chaque application (type cellulaire, configuration de mesure, sensibilité de la mesure...) nécessite une forme, un diamètre de pipette et un type de verre spécifique. Malgré tout, il semble que pour les mesures en configuration cellule-entière sur des cellules de mammifère d'une dizaine de micromètre de diamètre, les micropipettes de patch-clamp possèdent un diamètre de 1 à 3 μm environ. De plus la plupart de ces travaux mentionnent l'importance de la propreté de la pipette, de sa rugosité (sans toutefois jamais la quantifier), et de l'aire de contact offerte à la cellule. Nous avons donc basé la conception des

premières puces sur ces critères ainsi que sur les recommandations d'électrophysiologistes expérimentés du CEA Grenoble.

Compte tenu de la nécessité d'une faible rugosité reportée dans la bibliographie relative au patch-clamp conventionnel, la couche d'oxyde a été réalisée par oxydation thermique du silicium. En effet le procédé de croissance d'oxyde thermique permet d'obtenir des valeurs de rugosité très faible, de l'ordre de l'Angström. Enfin, nous avons gravé des microtrous de 2.5 μm de diamètre sur les premières puces destinées à la validation de notre système planaire.

2.2. Détail du procédé de fabrication

Au cours de mes travaux, plusieurs types de puces ont été fabriqués. Les modifications concernent les caractéristiques du microtrou (diamètre, forme, et hauteur) et celles de surfaces (matériau, rugosité, énergie de surface). Le principe de fabrication décrit ci-dessous (Figure 24) pour une puce avec un trou de 2.5 μm de diamètre et une membrane en SiO_2 de 2 μm d'épaisseur, est commun à tous ces types de puces.

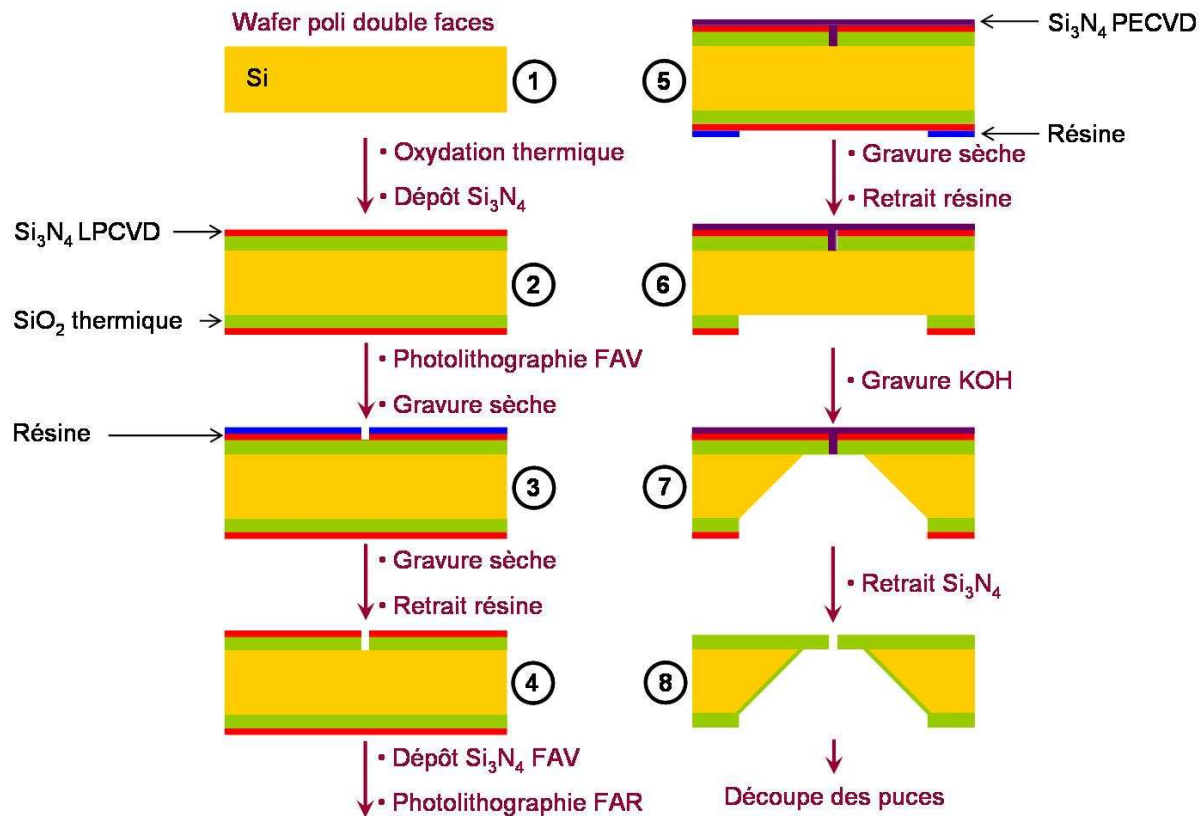


Figure 24 : procédé de fabrication de la puce silicium. La fabrication est divisée en 2 grandes étapes : de 1 à 5, gravure RIE (Reactive Ion Etching) du microtrou sur la face avant de la puce (FAV), et de 6 à 8 gravure KOH sur la face arrière (FAR) pour créer un accès au microtrou.

L'étape débute par l'oxydation thermique humide d'une plaque de silicium orienté $\langle 100 \rangle$ polie double face, jusqu'à obtenir une épaisseur de 2 μm de SiO_2 sur les deux faces. Le microtrou est ensuite réalisé sur la face avant de la puce par gravure sèche RIE (Reactive Ion Etching). Après dépôt d'une couche de protection de Si_3N_4 PECVD (Plasma Enhanced

Chemical Vapor Deposition) sur la face avant, une ouverture est créée en face arrière par une gravure chimique KOH. La couche de protection Si_3N_4 PECVD empêche la surgravure du microtrou. En effet, la gravure humide par KOH attaque les couches de SiO_2 mais à une vitesse beaucoup plus lente que le silicium (environ 1 nm/min contre 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ respectivement). Toutefois, durant le temps nécessaire pour graver l'épaisseur de 450 μm de silicium, le SiO_2 thermique dans le microtrou serait partiellement gravé. L'utilisation d'une couche de Si_3N_4 PECVD qui masque le microtrou permet de contourner ce problème, puisque le Si_3N_4 est un matériau inerte à la potasse. La gravure KOH sélective selon les plans cristallographiques $\langle 111 \rangle$ du silicium permet d'obtenir un accès jusqu'à la membrane constituée de 2 μm de SiO_2 . La puce ne subissant aucune oxydation à la fin du procédé, les pentes de la gravure KOH sont naturellement recouvertes d'un oxyde natif SiO_2 de 10 à 20 Å en général.

Au final, la puce obtenue comporte un microtrou de 2.5 μm de diamètre, dans une membrane de SiO_2 de 2 μm d'épaisseur.

3. Assemblage et poste de mesure

3.1. Description des différents éléments assemblés

Mon travail a consisté à concevoir un assemblage simple de plusieurs modules et à valider chaque étape de l'assemblage pour, au final, mettre au point un protocole complet de mesure de patch-clamp planaire.

Le microsystème que j'ai développé permet :

- de tester des puces différentes sans jamais modifier les divers modules de l'assemblage,
- de dispenser les fluides de part et d'autre de la puce, afin d'avoir accès aux deux faces de la cellule,
- de mesurer les courants ioniques par l'intermédiaire d'électrodes Ag/AgCl,
- de synchroniser la mesure électrique avec la dispense des fluides, pour étudier des canaux chemo-sensibles,
- de tester des cellules de taille différente allant des cellules de mammifères de 10 à 20 μm de diamètre aux ovocytes de Xénope de 800 μm de diamètre environ,
- d'utiliser les amplificateurs commerciaux de patch-clamp existant dans les laboratoires.

Les 9 microtrous de la puce disposée dans l'assemblage forment ainsi 9 sites de mesures indépendants électriquement et fluidiquement [95, 98].

Cet assemblage est composé de plusieurs modules (Figure 25 et Figure 26) :

- un circuit imprimé : il comporte 9 électrodes d'argent, disposées en vis à vis des microtrous sur la puce silicium. Chacune de ces électrodes circulaires est percée de 2 orifices de 400 μm de diamètre, qui permettent d'insérer et de coller des capillaires pour faire circuler les fluides dans la partie inférieure du site de mesure.
- des joints toriques : placés de part et d'autre de la puce, ils définissent une fois pressés ce que l'on nommera les chambres fluidiques supérieure et inférieure. Ces joints sont fabriqués en nitrile, matériau reconnu pour sa très grande résistance chimique et sa faible adsorption de substances. Nous avons vu en effet dans la partie B.3.3 du chapitre 1 concernant les verrous technologiques inhérents à la technique du patch-clamp planaire que l'adsorption des molécules hydrophobes était un problème majeur ; par l'utilisation de ce matériau nous espérons limiter ce problème. De plus, grâce à sa grande dureté (~ 70 Shore A), le nitrile est

un polymère dont la déformation est parfaitement contrôlée et limitée lors de l'écrasement. Ainsi à l'assemblage le serrage est reproductible et réalisé sans contrôle puisque les joints ne se déforment qu'au maximum de 10%.

- des grilles de positionnement en plastique: d'une épaisseur inférieure à celle des joints (dans leur état écrasé), ces grilles sont placées de part et d'autre de la puce et permettent un positionnement aisé des joints au niveau des 9 sites de mesure. La grille de l'étage inférieur possède également des ergots qui guident le positionnement de la puce lors du montage.
- un capot supérieur : ce capot peut-être soit un circuit imprimé similaire à celui de l'étage inférieur, soit une grille plastique. Dans le premier cas, l'assemblage est totalement symétrique par rapport à la puce, mais l'opacité du circuit imprimé et la présence des capillaires empêchent toute observation du site de mesure sous un microscope. Avec la deuxième option que j'ai utilisée tout au long de ma thèse, la grille plastique permet de presser les joints supérieurs tout en laissant un accès visuel et physique au microtrou. La chambre fluidique supérieure ainsi créée est totalement ouverte et un filament d'argent chloruré joue le rôle de l'électrode de référence (à la masse).

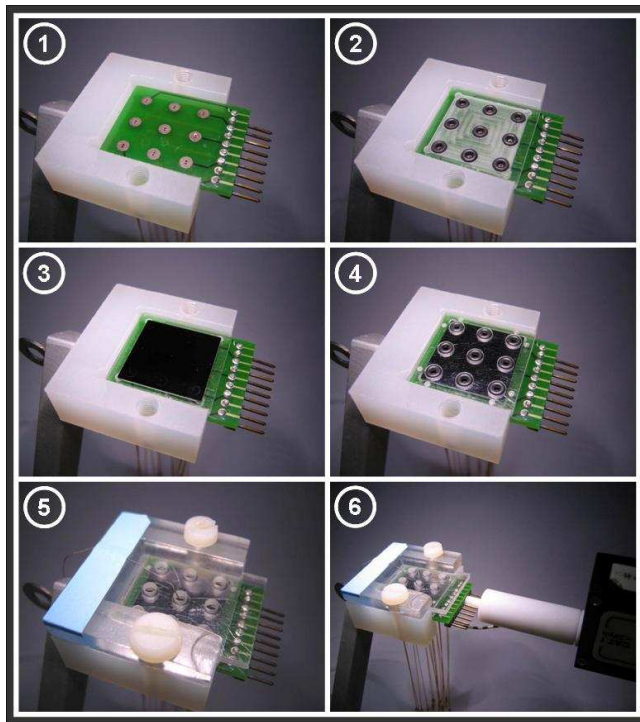


Figure 25 : Etapes d'assemblage du système.

1 : le circuit imprimé inférieur, constitué des 9 électrodes Ag/AgCl, est disposé sur la mâchoire inférieure en forme de U. Chaque électrode est traversée par 2 capillaires pour la dispense des fluides.

2 : une grille plastique permet de répartir les 9 joints toriques.

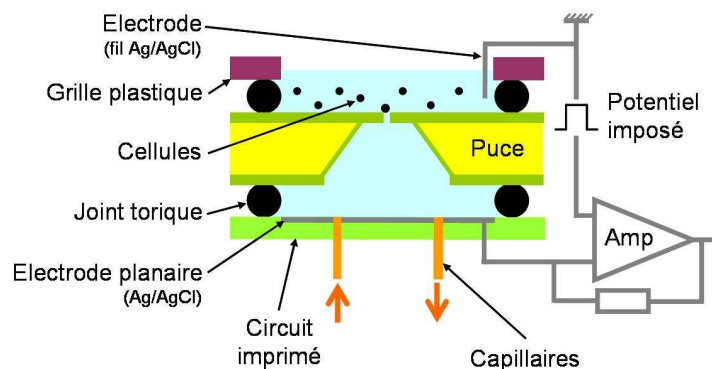
3 : la puce en silicium est positionnée dans la partie de la grille plastique prévue à cet effet.

4 : une nouvelle grille plastique permet de disposer les joints de l'étage supérieur.

5 : une fois le capot supérieur placé, la partie supérieure de la mâchoire permet de presser l'assemblage.

6 : les électrodes du site de mesure souhaité sont connectées au préamplificateur : au moyen d'un connecteur en Téflon pour l'électrode de mesure et à l'aide d'un fil pour l'électrode de référence (masse).

Figure 26 : schéma représentant une coupe du système au niveau d'un des neuf sites de mesure.



Tous les éléments constituant l'assemblage sont réutilisables à chaque montage, après avoir été soigneusement nettoyés. Les électrodes d'argent doivent être régulièrement chlorurées avec de l'eau de javel pure (1 ou 2 fois par semaine suivant la fréquence des expériences).

3.2. Connexion fluidique

Les solutions électrophysiologiques sont dispensées dans les chambres fluidiques grâce à des capillaires traversant le circuit imprimé au niveau des électrodes. Chaque chambre de mesure est équipée de deux capillaires, un d'entrée et un de sortie. Ces capillaires en silice, de 250 μm et de 360 μm de diamètre intérieur et extérieur respectivement, sont directement collés au circuit imprimé avec une colle activée par rayons ultraviolets. Les fluides sont dispensés avec des seringues par l'intermédiaire de capillaires en Téflon de 300 μm de diamètre interne connectés et collés à ceux en silice.

Notons que le choix du matériau des capillaires a été fait de manière à s'affranchir au maximum des problèmes d'adsorption de molécules hydrophobes.

3.3. Connexion électrique

La mesure des courants ioniques est assurée par les électrodes Ag/AgCl déposées sur le circuit imprimé (Figure 26). Ces électrodes sont réutilisables, comme le circuit imprimé, et possèdent une grande stabilité mécanique grâce au protocole de fabrication suivi : les électrodes sont d'abord collées à chaud avec un film de cuivre ; après une attaque chimique afin de créer une porosité dans le métal, un dépôt de 40 μm de cuivre est réalisé par électrolyse ; enfin, après une nouvelle attaque chimique similaire à la première, une épaisseur de 1 à 2 μm d'argent électrolytique est déposée. Ce procédé nous a permis d'obtenir des électrodes stables pouvant être chlorurées à de très nombreuses reprises. Typiquement, les électrodes ne se dégradent pas avant une durée de 6 mois d'expériences intensives. Les électrodes sont reliées par les pistes à des broches sur le bord du circuit imprimé.

La connexion du circuit imprimé à la tête d'amplification de l'amplificateur commercial a constitué une étape plus délicate. L'étage supérieur possède les électrodes de référence (à la masse) et n'est donc pas sensible aux perturbations électriques causées par une mauvaise connexion ; nous relierons donc cette électrode et la tête d'amplification par un fil électrique classique. Par contre, la connexion des électrodes de mesure est plus critique : le connecteur doit être rigide, car toute vibration générerait du bruit dans la mesure. De plus, il doit être isolé du milieu environnant de manière à ne pas constituer une antenne captant les perturbations extérieures en particulier le 50 Hz. A l'instar du holder (pièce qui permet de maintenir la pipette et de la relier à l'étage d'amplification) utilisé en patch-clamp conventionnel, le matériau employé doit être peu bruiteux et inerte, et est souvent choisi empiriquement [54, 55]. Les holders sont la plupart du temps fabriqués en Polycarbonate ou en Teflon, matériaux possédant une très faible dissipation diélectrique. Nous avons donc conçu une pièce en Teflon de 4 cm de long et de 1 cm de diamètre, dans laquelle est tendu un fil électrique (Figure 25, étape 6).

3.4. Poste de mesure

L'assemblage est placé dans une cage de Faraday et sous un stéréo-microscope droit pour permettre la visualisation des cellules lors de la phase de positionnement par aspiration (Figure 27).

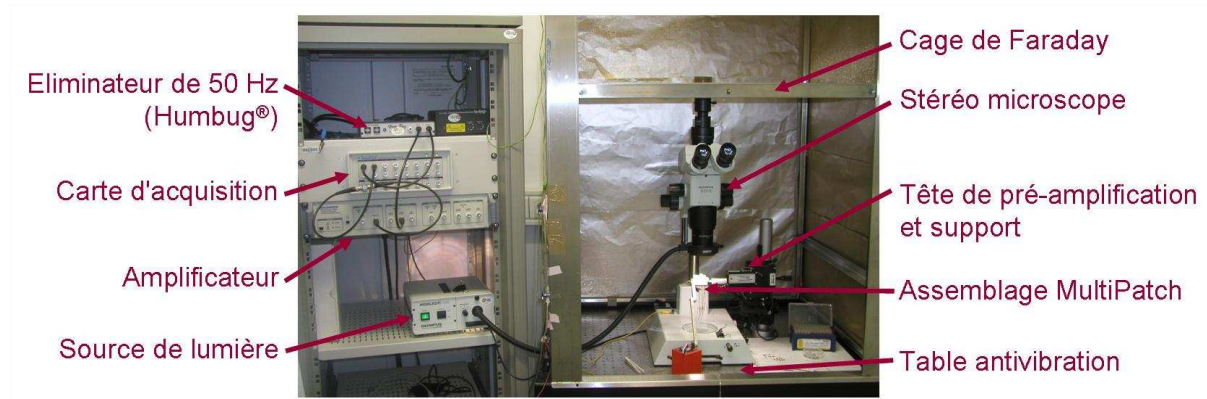


Figure 27 : photo du poste de patch-clamp planaire du laboratoire Biopuces.

4. Formation du scellement: principe et déroulement

4.1. « Mise en eau » du système et mesures à vide

La « mise en eau » du système débute par le remplissage de la chambre inférieure avec la solution électrophysiologique équivalente au milieu intrapipette. Le fluide est injecté via le capillaire d'entrée à l'aide d'une seringue et ressort par le capillaire de sortie. Petit à petit il remonte sous le microtrou et le traverse, formant sur la face supérieure un ménisque; la solution extrapipette peut alors être dispensée dans la chambre supérieure. Lors de l'utilisation de certains types de puces, le milieu intrapipette ne traverse pas le microtrou car soit l'hydrophilie de la surface est faible, soit le trou a un facteur d'aspect³ élevé (faible diamètre et hauteur importante) : dans ce cas l'étape de remplissage de la chambre inférieure peut être précédée par une phase de prémouillage avec de l'éthanol à 70 % qui est rincé par la suite avec le passage de la solution intrapipette.

4.2. Formation du scellement et passage en cellule entière

Afin de détecter le positionnement de la cellule sur le microtrou et de suivre l'évolution de la formation du scellement, la résistance du microtrou est mesurée en continu. Cette mesure est réalisée en imposant tout au long de l'expérience un potentiel sous forme de créneau de 1 à 5 mV et de fréquence 50 ou 100 Hz ; la mesure du courant en réponse à ce potentiel permet de calculer la résistance en temps réel.

La phase de formation du scellement commence par l'injection d'une suspension cellulaire dans la chambre supérieure. L'expérimentateur doit alors immédiatement pratiquer une

³ Facteur d'aspect : rapport de la profondeur du trou sur son diamètre.

aspiration (à la bouche comme en patch-clamp conventionnel ou à l'aide d'une colonne d'eau constituant un réservoir de pression) dans la chambre inférieure de manière à positionner la cellule sur le microtrou. Il ne dispose en effet que d'une vingtaine de seconde pour attirer une cellule. Passé ce délai, la majorité des cellules a sédimenté sur la surface de la puce et il devient impossible de les déplacer. La force d'aspiration à appliquer dépend évidemment de la résistance fluïdique que forme le microtrou, mais elle est généralement comprise entre 20 et 50 mbar. A titre d'exemple, dans le cas de l'utilisation d'un microtrou de $0.5 \text{ M}\Omega$ de résistance, lorsqu'une cellule se positionne la résistance augmente de manière immédiate jusqu'à atteindre 10 ou 20 $\text{M}\Omega$.

Une fois la cellule positionnée, l'aspiration est maintenue constante jusqu'à l'obtention d'une résistance de scellement élevée, supérieure à 100 $\text{M}\Omega$, voire supérieure à 1 $\text{G}\Omega$. Lors de cette étape de formation du scellement, il est possible d'hyperpolariser la membrane, c'est-à-dire d'imposer un potentiel constant négatif sur l'électrode de mesure (inférieure) qui peut varier entre 0 et -70 mV. Cette hyperpolarisation de la membrane aide à la formation du scellement dans la plupart des cas [35, 55].

Lorsque la résistance de scellement est suffisamment élevée et stable (au moins supérieure à 100 $\text{M}\Omega$ pour les enregistrements en cellule entière), l'aspiration peut être relâchée, l'étape de passage en configuration cellule entière s'effectue ensuite en couplant une aspiration légère (de 50 mbar environ) à un Zap d'une durée comprise entre 0.5 et 2 ms (le Zap est un pulse de 1V durant une durée déterminée par l'expérimentateur).

4.3. Mesure des courants

Les mesures de courants ioniques ont été réalisées avec une électronique de patch-clamp classique, comprenant un amplificateur Axon MultiClamp 700A, un tête d'amplification CV-7B, une carte d'acquisition Digidata 1322 et le logiciel associé pClamp9. Le choix de cet amplificateur a été motivé par la présence de 2 voies de mesures parallèles, ce qui nous sera utile dans la phase de parallélisation.

B. Etablissement d'un protocole de test, preuve de faisabilité

1. Nettoyage des puces

Après leur fabrication, les puces en silicium sont nettoyées avec un acide de Caro, appelé communément Caro (mélange $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ dans un rapport 2/1). L'acide de Caro est utilisé en tant que nettoyant, pour enlever les molécules organiques des substrats. Il permet également d'hydrolyser diverses surfaces et de les rendre hydrophiles. Il est fréquemment utilisé dans l'industrie microélectronique pour nettoyer les plaques de silicium.

Avant leur utilisation avec des cellules, trois nettoyages successifs des puces au Caro sont nécessaires afin de s'assurer de leur propreté et de leur fonctionnalité. Des tests préliminaires m'ont en effet montré qu'un nombre inférieur de nettoyage ne permet pas d'avoir des mesures de résistance du microtrou (sans cellules) reproductibles : la dispersion des valeurs est certainement due à des impuretés présentes au niveau des microtrous qui disparaissent au fur et à mesure des nettoyages. Par ailleurs ce nettoyage rend les surfaces hydrophiles, ce qui se

traduit sur nos puces par une diminution de l'angle de goutte de 25° à 5°. Ceci facilite le remplissage sans bulles d'air du système par les fluides.

Le Caro étant réputé pour éliminer les molécules organiques des surfaces, nous avons tenté de nettoyer des puces utilisées avec des cellules. Nous avons alors constaté que le nettoyage au Caro permet de recycler les puces et de les réutiliser sans incidence sur la formation des scellements.

2. Validation de la fluidique et suspension cellulaire

Comme nous l'avons évoqué au cours du chapitre 1, l'étape de positionnement de la cellule sur le microtrou conditionne le succès de l'expérience. En effet, il est nécessaire de disposer d'une part d'une aspiration très sensible et d'autre part d'une suspension de cellules individualisées et sans agrégats.

2.1. Protocole de remplissage

Le remplissage du système est une étape délicate puisqu'il faut proscrire la présence de bulles d'air qui, par leur dilatation, empêchent une aspiration efficace lors de la phase d'attraction de la cellule sur le microtrou. C'est pourquoi les solutions utilisées lors de la mise en œuvre du système sont systématiquement dégazées et filtrées de manière à éviter la pollution et le bouchage du microtrou par des poussières.

Pour vérifier que le remplissage du système est correctement réalisé, nous disposons de trois tests électriques :

- la résistance électrique à vide du microtrou (c'est-à-dire en milieu liquide mais sans cellule) doit être conforme à la valeur théorique. En effet, la présence d'une bulle d'air au niveau du microtrou a pour effet d'augmenter la résistance mesurée. La prédiction de la valeur mesurée est aisée, car dans le cas d'une ouverture cylindrique, la résistance électrique R_{trou} vaut:

$$R_{\text{trou}} = \rho \frac{l}{S} \quad \text{Équation 5}$$

avec ρ la résistivité de la solution électrophysiologique (en $\Omega \cdot \text{m}$), l la hauteur du trou (en m) et S la section du trou (en m^2). Prenons l'exemple d'un trou de 2.5 μm de diamètre, d'une membrane de SiO_2 de 2 μm d'épaisseur et d'une solution de résistivité 0.8 $\Omega \cdot \text{m}$: la résistance du trou vaut 0.35 M Ω . Il faut noter que cette résistance est bien supérieure à celle du fluide dans la chambre de mesure formée, par exemple, par un joint torique de 3 mm de diamètre interne et de 1 mm d'épaisseur. En effet, un calcul rapide permet de déterminer que cette résistance est de l'ordre de 110 Ω , et donc négligeable devant la résistance du microtrou.

- le contrôle de la valeur du potentiel de jonction. Ce potentiel de jonction est le potentiel généré à l'interface de deux solutions ioniques de composition et de concentration différentes. La présence d'une bulle d'air proche de cette interface peut augmenter de manière considérable la valeur de ce potentiel. Dans notre cas, lorsque les solutions intra et extrapipette sont identiques, le potentiel vaut 0 mV et lorsqu'elles sont différentes, compte tenu des espèces ioniques et des concentrations courantes

utilisées, le potentiel de jonction est généralement compris entre 30 mV et – 30 mV : la présence d'une bulle d'air peut engendrer des potentiels de 100 ou 200 mV. L'amplificateur de patch-clamp permet de mesurer et de compenser ce potentiel pour ramener la ligne de base du courant mesuré à 0 A.

- le contrôle de la capacité de la puce. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la capacité mesurée de la puce en silicium dépend d'une part de l'épaisseur de la couche isolante qui la recouvre et d'autre part de la surface de milieu salin en contact avec cet isolant. Si une bulle d'air est présente au niveau de la puce, la surface de contact du fluide conducteur est diminuée; l'air représentant une couche d'isolant supplémentaire, la capacité mesurée de la puce est alors anormalement basse. Par exemple, pour une puce d'une capacité théorique de 100 pF, la présence d'une bulle d'air peut engendrer la mesure d'une capacité de 10 pF seulement.

2.2. Suspension cellulaire

2.2.1. Préparation et conservation des cellules

La préparation des cellules débute par le décollement du tapis cellulaire formé dans la boîte de culture. Le tapis cellulaire est tout d'abord rincé avec une solution tampon phosphatée, le PBS (Phosphate Buffer Saline). Les cellules sont ensuite décollées avec une enzyme, l'accutase, plutôt que la trypsine. D'après Tao *et al* [63], l'accutase est en effet plus efficace pour la formation du scellement. Les cellules ainsi décollées semblent conserver une meilleure intégrité de membrane et une morphologie optimisée. Il est également reporté que cette enzyme n'altère pas la fonctionnalité des canaux ioniques [63]. Le nombre d'agrégats est ainsi réduit et la suspension est très homogène, ce qui rappelons-le, est déterminant pour immobiliser avec précision une cellule individualisée sur le microtrou. Après détachement, les cellules sont centrifugées (360g, 5 min) et resuspendues dans un mélange de PBS/accumax⁴ pendant 5 min de façon à dissocier les cellules qui seraient encore agrégées. Enfin, après une nouvelle centrifugation (360g, 5 min), les cellules sont disposées dans le milieu électrophysiologique correspondant au milieu extrapipette à une concentration donnée (cf paragraphe B.1.2.2) et gardées à 20°C sous l'agitation d'un carrousel. Le milieu extrapipette contient la plupart du temps des ions divalents comme le calcium et le magnésium, qui favorisent l'adhésion des cellules entre elles et donc la formation d'agrégats. L'agitation est donc indispensable pour éviter la formation d'agrégats pendant deux à trois heures, temps nécessaire pour effectuer les mesures de courants sur les 9 sites d'une puce de manière séquentielle.

2.2.2 Détermination de la concentration cellulaire optimale dans la chambre de mesure

La concentration de la suspension cellulaire est un paramètre primordial pour la réussite d'une expérience de patch-clamp planaire, le but étant d'attirer une cellule sur le microtrou dans 100% des cas. Rappelons qu'en patch-clamp conventionnel, ce paramètre est moins critique dans la mesure où l'expérimentateur sélectionne une cellule d'intérêt à l'aide de la micropipette. Une idée évidente consiste alors à penser qu'il faille préparer une suspension

⁴ La solution accumax est un mélange de protéases, de collagénolytiques et de DNase.

cellulaire de concentration très élevée de manière à recouvrir totalement la surface de la puce une fois les cellules sédimentées et ainsi augmenter les chances de capture par aspiration. Toutefois deux arguments nous permettent d'exclure cette solution. D'une part, si la concentration de la suspension est trop élevée, il existe une très forte probabilité pour qu'une seconde cellule sédimente sur celle capturée par aspiration et déstabilise ainsi le scellement en formation. D'autre part, une forte concentration dans la suspension cellulaire augmente les risques de formation d'agrégats lors de la conservation des cellules, évènement à proscrire totalement.

Il a donc été nécessaire de déterminer une concentration cellulaire optimale permettant de capturer une cellule sur le microtrou dans 100% des cas, tout en respectant nos critères de conservation de la suspension pendant les 3 heures d'expérience. Pour cela, j'ai dans un premier temps observé avec un stéréo-microscope le rayon d'influence d'une aspiration de 50 à 100 mbar pratiquée à travers le microtrou. Le résultat de ces observations révèle que dans quasiment 100% des cas, les cellules situées dans un rayon de 30 à 50 μm (noté r_i , rayon d'influence de l'aspiration dans la Figure 28) sont attirées sur le microtrou (ce rayon dépend évidemment du facteur d'aspect du microtrou). J'ai ensuite considéré l'hypothèse suivante : toutes les cellules disposées dans la chambre sédimentent sur la surface en se répartissant de manière homogène selon un pas régulier correspondant aux rayons d'influence déterminés précédemment (Figure 28). Cette hypothèse grossière permet néanmoins d'estimer un ordre de grandeur de la densité surfacique cellulaire dans un premier temps. Ainsi un tapis de cellules disposées selon un pas régulier de 30 μm , correspond à une densité de 1100 cellules par mm^2 et donc à une concentration de 1100 cellules par μL , soit $1,1 \times 10^6$ cellules par mL . De la même manière, un tapis cellulaire avec un pas régulier de 50 μm donne une concentration cellulaire de 4×10^5 cellules par mL . Expérimentalement, nous avons vérifié que l'utilisation d'une suspension cellulaire de concentration comprise entre 0,4 et 1×10^6 cellules/ mL permet d'obtenir le positionnement d'une cellule sur le microtrou dans presque 100% des cas. Par ailleurs, ces concentrations correspondent à celles de la littérature du patch-clamp planaire [82, 85, 87, 99]. Enfin, cette gamme de concentration cellulaire permet également de conserver une suspension sans agrégats pendant au moins 3 heures sous agitation dans du milieu électrophysiologique.

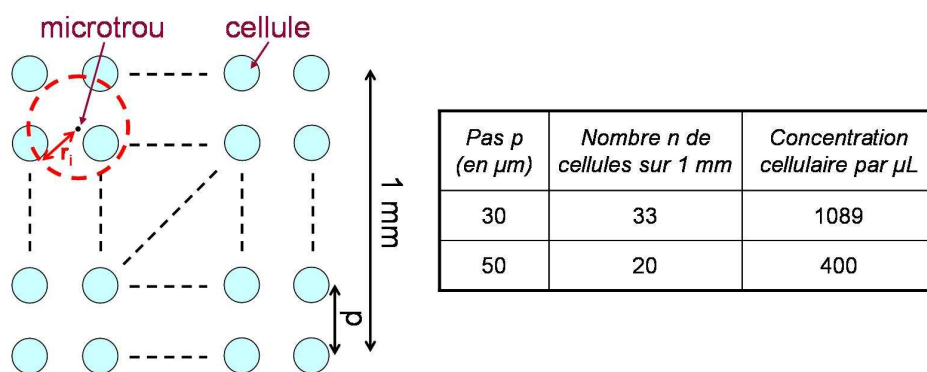


Figure 28 : répartition des cellules sur la surface de la puce. L'hypothèse est faite qu'après sédimentation les cellules sont disposées de manière homogène sur la surface selon un pas régulier p . A partir de la densité de cellules sédimentées sur la surface, il est alors possible de calculer la concentration de la suspension cellulaire. r_i est le rayon d'influence de l'aspiration.

3. Mesures de scellements des cellules sur la puce

3.1. Introduction: premières constatations

La preuve de concept a été obtenue en premier lieu sur les puces en silicium décrites dans le paragraphe A.2 de ce chapitre. En résumé, ces puces présentent une membrane de SiO_2 thermique de $2\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur, recouverte d'une fine couche de Si_3N_4 , dans laquelle est gravé un microtrou de $2.5\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. En suivant le protocole décrit dans les paragraphes précédents, les premières mesures de résistance de scellement de cellules atteignaient un maximum de $50\text{ M}\Omega$. Ces résistances de scellement insuffisantes pour l'enregistrement de courants ioniques nous ont donc encouragés à modifier la puce et plus particulièrement à redimensionner les caractéristiques du trou et à modifier les propriétés de la surface.

3.2. Conception d'une nouveau type de puces

3.2.1. Motivations

Plusieurs travaux, concernant la technique de patch-clamp traditionnelle, font référence à l'état de surface ainsi qu'aux dimensions du microtrou pour faciliter la formation du scellement. Ainsi, Corey et Stevens [96] ont montré que les surfaces hydrophiles favorisaient le scellement de la membrane cellulaire sur le substrat. Dans cette optique, nous avons réalisé un dépôt de SiO_2 par PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition), matériau qui présente des angles de mouillage plus faibles que ceux de la silice thermique initialement présente sur la puce. Par ailleurs, ce dépôt permet de réduire les dimensions du trou pour obtenir un diamètre inférieur à $2.5\text{ }\mu\text{m}$ ce qui augmente la résistance à vide du trou et peut favoriser une augmentation de la résistance de scellement [35, 97].

3.2.2. Fabrication

Une couche de SiO_2 PECVD a été déposée sur le SiO_2 thermique initialement en surface de la puce décrite dans le paragraphe A.2. Nous avons réalisé des dépôts de trois épaisseurs différentes, $0,5$, 1 et $1,5\text{ }\mu\text{m}$ (dépôts réalisés à une température de 300°C à une vitesse de $1300\text{ }\text{\AA}/\text{min}$). Les valeurs de résistance de scellements de cellules ont été déterminées uniquement sur les puces possédant une couche supplémentaire de $1,5\text{ }\mu\text{m}$, les puces aux épaisseurs intermédiaires n'étant fabriquées que pour étudier et suivre la forme du dépôt au niveau du microtrou.

Nous avons caractérisé ces nouvelles puces en terme de rugosité, de dimension et de forme du microtrou et de capacité à former des scellements résistifs sur la membrane cellulaire. Une comparaison systématique des résultats avec ceux obtenus avec le type de puces initial a permis de définir les orientations de recherches futures.

3.3. Caractérisations des puces

Le dépôt de SiO_2 PECVD modifie les propriétés de surface

Comme nous l'avons évoqué, le choix du dépôt PECVD sur la puce a été motivé pour augmenter l'hydrophilie des puces initiales. Les angles de contact sont en effet de 25° pour le SiO_2 PECVD comparé à 30° pour le SiO_2 thermique.

L'influence du procédé de passivation sur la topographie de la surface a été analysée par AFM (Atomic Force Microscopy). Le Si_3N_4 apparaît extrêmement propre et homogène (Figure 29 C), alors que des aspérités et des irrégularités sont présentes sur le dépôt épais de SiO_2 PECVD (Figure 29 D). Les valeurs moyennes de rugosité (valeurs rms) calculées pour les deux échantillons sur une aire de $1 \mu\text{m}^2$, sont de 2.4 \AA dans le cas du SiO_2 thermique et de 25.5 \AA dans celui du dépôt PECVD [95] (article en Annexe 5).

Caractéristiques du microtrou

Les deux puces ont été observées par MEB (Microscopie Electronique à Balayage), dans le but de déterminer précisément les diamètres des microtrous avant et après le dépôt PECVD. Sur les puces comportant du SiO_2 thermique, le diamètre nominal du microtrou est de $2.5 \mu\text{m}$ et la photo MEB montre un cercle parfaitement défini (Figure 29 A). Le dépôt d'une couche de SiO_2 de $1.5 \mu\text{m}$ d'épaisseur a réduit le diamètre du trou à $1.7 \mu\text{m}$ et semble également avoir arrondi les bords du trou (Figure 29 B).

La reproductibilité et la précision du procédé de dépôt PECVD ont été évaluées en mesurant la résistance du microtrou R_{trou} pour chaque type de puce avec les différentes épaisseurs de 0.5 , 1 et $1.5 \mu\text{m}$. R_{trou} , mesure indirecte du diamètre de l'ouverture, a été déterminée en présence de la solution électrophysiologique intrapipette. Les résultats montrent une bonne corrélation entre la valeur de résistance et le diamètre du microtrou (Tableau 3).

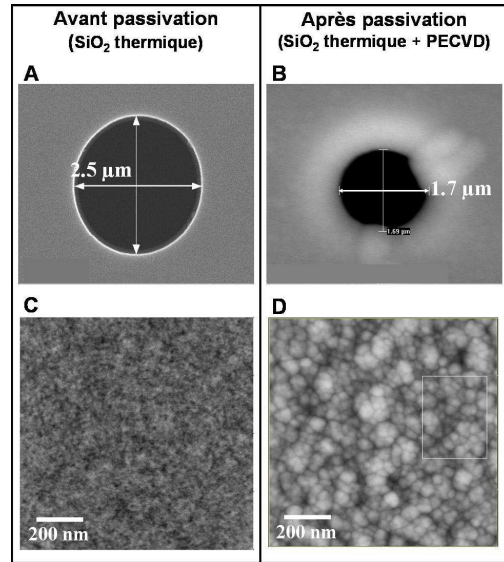


Figure 29 : site de mesure avec du SiO_2 thermique (colonne de gauche) et du SiO_2 PECVD (colonne de droite). Détermination par MEB du diamètre du microtrou avant (A) et après (B) passivation (couche de $1.5 \mu\text{m}$ de SiO_2 PECVD). Rugosité de la surface visualisée avant (C) et après (D) passivation.

Epaisseur du dépôt e_d (en μm)	\varnothing_d diamètre mesuré (en μm)	Résistance du microtrou R_t ($\text{M}\Omega$)	
		R_t (exp)	R_t (th)
0	2.50	0.55 ± 0.1	0.46
0.5	2.20	0.65 ± 0.1	0.62
1	1.95	0.85 ± 0.1	0.87
1.5	1.70	1.14 ± 0.1	1.24

Tableau 3 : effet du dépôt de SiO_2 PECVD sur la résistance du microtrou. Le diamètre du microtrou a été mesuré par MEB, les résistances théorique (th) et expérimentale (exp) sont reportées pour chaque épaisseur de dépôt. La résistance théorique a été calculée en considérant l'Equation 5 basée sur l'utilisation du modèle 2 (cf texte).

Expérimentalement, la valeur moyenne de la résistance pour un trou de $2.5 \mu\text{m}$ de diamètre est de $0.55 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$ et passe à $1.15 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$ lors du dépôt de $1.5 \mu\text{m}$ de SiO_2 . Dans le but d'étudier plus précisément l'influence des dépôts sur les caractéristiques du microtrou et en particulier sur sa forme, deux modèles ont été développés. Dans le modèle 1 (Figure 30 A), nous considérons que le dépôt PECVD confère une forme cylindrique à l'ouverture. Dans ce cas, l'Equation 5 qui donne la résistance est celle décrite dans le paragraphe B.1.1 de ce

chapitre. La Figure 30 C montre que les valeurs théoriques de la résistance du microtrou, calculées avec cette équation, sont plus importantes que les valeurs expérimentales. Dans le modèle 2, basé sur les observations MEB, nous supposons que le dépôt conduit à un microtrou en forme de « sablier » (Figure 30 B). Il a été considéré que l'ouverture possédait une symétrie axiale comme décrit dans la Figure 30 et ses contours ont été modélisés selon une demi ellipse. L'équation permettant de déterminer le diamètre du trou en fonction de la hauteur z est la suivante :

$$\phi = \phi_0 - (\phi_0 - \phi_d) \left[1 - \left(\frac{2z}{e_d + e_0} \right)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Équation 6}$$

avec ϕ_0 le diamètre initial du microtrou ($\phi_0 = 2.5 \mu\text{m}$), ϕ_d le diamètre mesuré après le dépôt PECVD, e_0 l'épaisseur initiale de la membrane et e_d l'épaisseur du dépôt. L'équation 4 a été discrétisée sur la hauteur totale ($e_d + e_0$) dans le but de calculer la valeur théorique de la résistance. La Figure 30 C et le Tableau 3 montrent une bonne corrélation entre les valeurs moyennes des résistances mesurées sur 4 diamètres de trous différents et le calcul théorique selon le modèle 2 [95].

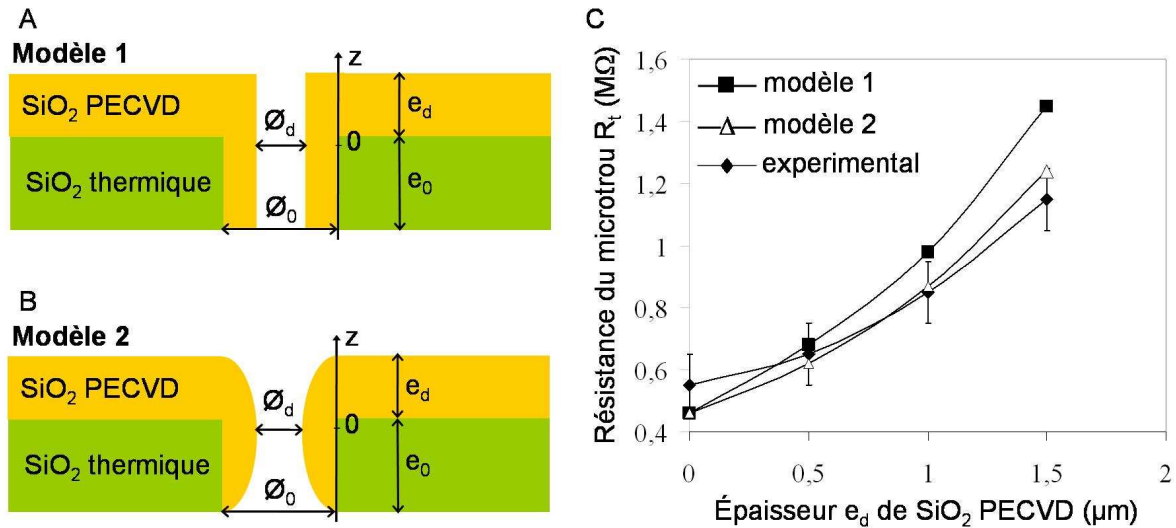


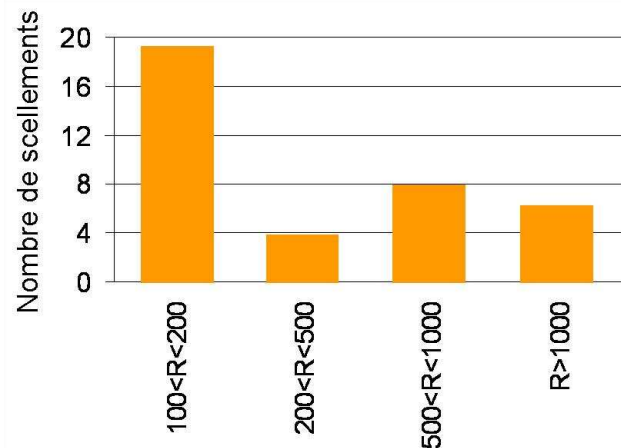
Figure 30 : Modélisation de la forme du microtrou après le dépôt de SiO₂ PECVD. A et B: schémas de la forme du microtrou après le procédé de dépôt PECVD suivant le modèle 1 (vue A) et le modèle 2 (vue B) ($\phi_0 = 2.5 \mu\text{m}$, $e_0 = 2.12 \mu\text{m}$, e_d épaisseur de SiO₂ PECVD et ϕ_d diamètre du trou après le dépôt). Graphe C : trois épaisseurs de dépôts sont reportées avec les valeurs de résistances théorique et expérimentale correspondantes. Les résultats expérimentaux portent sur 5 valeurs mesurées pour chaque épaisseur (\pm écart type).

3.4. Le dépôt SiO₂ PECVD améliore le scellement des cellules

L'étude du scellement des cellules sur les deux types de puce a été réalisée avec des cellules CHO. Ces cellules ont été préparées à la concentration décrite dans le paragraphe B.1.2 de ce chapitre. Selon les résultats, la couche de SiO₂ PECVD d'épaisseur 1.5 μm permet d'augmenter le taux de scellements de 0 % (pas de scellements supérieurs à 100 MΩ sur n=30 mesures sans la couche PECVD) à 23% (37 scellements supérieurs à 100 MΩ sur n=157

mesures avec la couche de passivation). Si l'on prend en compte toutes les valeurs de scellement, la valeur moyenne des résistances de scellement de cellules sur les microtrous varie de 30 MΩ sur le SiO₂ thermique (n=30) à 155 MΩ (n=157) avec le dépôt SiO₂ PECVD. Plus précisément, sur les puces comportant le dépôt supplémentaire de SiO₂ PECVD, 19 scelllements sur 37 sont compris dans une gamme de 100-200 MΩ, 4 entre 200-500 MΩ, 8 entre 500-1000 MΩ, et enfin 6 supérieurs à 1 GΩ, la valeur maximale atteignant 7 GΩ (Figure 31, [95]).

Figure 31 : Distribution des résistances de scelllements supérieures à 100 MΩ obtenues sur les puces comportant la couche de SiO₂ PECVD



Si les résistances de scellement obtenues sur le premier type de puces (SiO₂ thermique en surface) étaient insuffisantes pour enregistrer des courants ioniques en configuration cellule entière, celles obtenues sur le deuxième type de puces (ajout d'une couche de SiO₂ PECVD) permettent d'enregistrer l'activité ionique des canaux.

4. Enregistrements de courants ioniques sur cellules recombinantes

4.1. Choix des modèles de canaux ioniques

Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre, le silicium ne constitue pas un substrat idéal pour la mesure des courants très faibles de l'ordre du picoampère. En effet sa capacité intrinsèque importante le rend très sensible aux perturbations électriques environnantes, et les puces en silicium engendrent des mesures avec un rapport signal sur bruit plus faible que lors de l'utilisation de puces en verre ou polymères. Ce point nous a amenés à privilégier les mesures en cellule entière, aux amplitudes de courant souvent comprises entre 100 pA et 10 nA. Par ailleurs cette configuration est celle utilisée par les industries pharmaceutiques. De même, j'ai utilisé des lignées de cellules de mammifères d'expression stable car le système ne permet pas, dans sa première génération, de trier des cellules transfectées transitoirement (les lignées cellulaires ont été élaborées par la société CreaCell, implantée à La Tronche, 38, [100], cf poster en Annexe 7).

Dans la phase de validation du système, j'ai privilégié des modèles de canaux ioniques aux propriétés suivantes :

- conductance unitaire importante. Cette propriété, couplée au fait que les mesures sont réalisées en configuration cellule entière, doit permettre d'enregistrer des courants

ioniques supérieurs à 1 nA. On s'assure ainsi que les mesures posséderont un rapport signal sur bruit important malgré les résistances de scellements encore faibles et la capacité importante de la puce.

- voltage-dépendants. Un des objectifs de mes travaux reste l'optimisation des paramètres de la puce pour améliorer le scellement de la membrane cellulaire et dans cette optique, seuls des canaux voltage-dépendants ont été étudiés. A la différence des canaux chemo-sensibles, les canaux voltage-dépendants ne requièrent aucune intervention et ajout de molécule durant la mesure, rendant ainsi la phase de validation plus simple.
- possédant des signatures électriques bien caractérisées et spécifiques.
- présentant un profil électrique caractéristique en présence d'inhibiteurs.

Ainsi mon choix s'est porté sur deux types de canaux potassiques voltage-dépendants : les canaux BK(Ca) et IRK1. Les signatures électriques particulières des canaux BK(Ca) et IRK1, respectivement rectifiant sortant et rectifiant entrant, représentent des profils électriques modèles pour la validation de notre puce patch-clamp. Par ailleurs, les canaux potassiques voltage-dépendants sont des cibles connues de molécules thérapeutiques ou de cations, de même qu'ils constituent d'excellents transducteurs dans le domaine des biocapteurs [101]. Pour ces raisons, de nombreux efforts sont concentrés sur la compréhension des propriétés ainsi que sur l'identification de nouveaux activateurs ou antagonistes [43, 102]. Cet intérêt croissant porté aux canaux voltage-dépendants a motivé notre choix pour les choisir en tant que canaux modèles pour la validation de notre microsystème. Les canaux BK(Ca) à grande conductance activés par le calcium et le potentiel, appelés aussi canaux « maxi-K » (en référence à leur conductance unitaire de 250 à 300 pS), permettent la mesure de courants de près de 10 nA lorsqu'ils sont surexprimés sur la membrane des cellules de mammifères comme les CHO ou les HEK-293. Enfin, nous nous sommes également intéressés aux canaux IRK1 dont la conductance unitaire (~ 30 pS) se rapproche des conductances moyennes de la majorité des canaux.

4.2. Résultats

Des courants potassiques ont été enregistrés en configuration cellule entière sur des cellules HEK-293 exprimant de manière stable les canaux BK(Ca) [95]. Les traces de courant dans la Figure 32 représentent la réponse en courant à treize sauts de potentiel de 0 mV à +120 mV (10 mV d'incrément à chaque saut) d'une durée de 400 ms chacun et démontrent les effets bloquant de l'Ibériotoxine (IbTX), un antagoniste spécifique de ces canaux. Les réponses en courant sont représentées de manière superposée pour constater clairement l'activation des canaux. Sur la trace de gauche (A), pour les potentiels imposés de 0 à +20 mV on mesure le courant correspondant à la résistance de scellement (ici 150 MΩ) puisque aucun canal BK(Ca) n'est activé, et à partir de +30 mV on constate une rupture de pente traduisant l'activation des canaux. Sur la trace de droite (A), les courants potassiques sortants sont fortement inhibés par 100 nM d'IbTX. Les courbes courant-tension correspondant à ces deux traces, après compensation de la résistance de fuite, indiquent une inhibition de 88 % des canaux BK(Ca) par l'IbTX (un blocage des canaux de 82 % ayant été obtenu sur des mesures en patch-clamp classique, menées en parallèle sur la même lignée cellulaire).

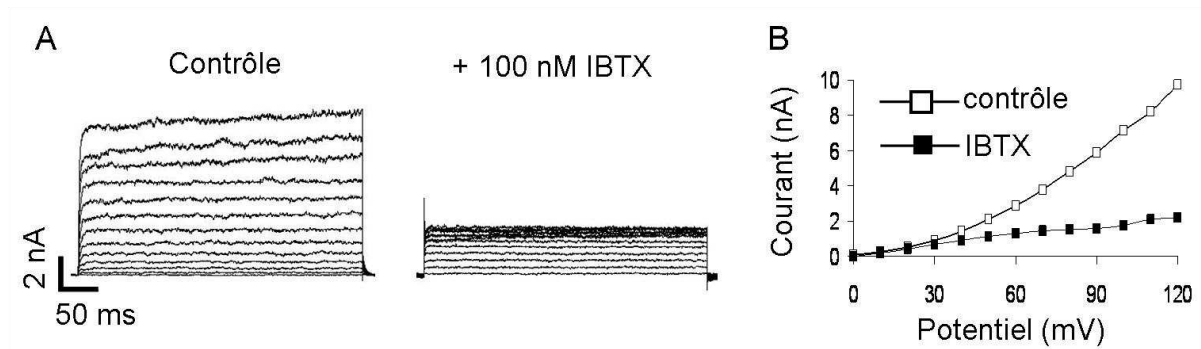


Figure 32 : Courants ioniques de canaux BK(Ca) enregistrés en cellule entière sur cellules HEK-293. A: courants potassiques rectifiants sortants activés par des sauts successifs de potentiel de 0 à +120 mV (par incréments de 10 mV). Résistance du scellement: 150 M Ω . Ces mesures montrent également l'inhibition des courants BK par 100 nM d'Ibériotoxine (IbTX), un bloqueur spécifique. B: courbes courant-tension obtenues à partir des traces de courants précédentes.

Dans le but de valider notre assemblage sur différents types cellulaires, nous avons entrepris d'analyser des canaux potassiques rectifiants entrants IRK1, exprimés de manière stable dans des cellules CHO [95]. Les canaux potassiques sont soumis à des potentiels de 0 à -120 mV (par des incréments de -10 mV) sur une durée de 200 ms. Les mesures d'activation et d'inhibition par 1mM de BaCl₂ (inhibiteur non spécifique) des courants IRK1, décrites dans la Figure 33, montrent une bonne corrélation entre la technique avec micropipette et la technique planaire. En effet les canaux s'activent dans les deux cas à partir d'un potentiel imposé de -70mV, valeur conforme à celle de la littérature [57]. La différence notable entre les deux mesures vient uniquement de la valeur de la résistance de scellement et donc du courant de fuite: dans le cas de la mesure en patch-clamp planaire, la résistance de scellement de l'ordre de 100 M Ω implique un courant de fuite plus important que dans le cas de la mesure avec la micropipette où la résistance est supérieure à 1 G Ω . Cette différence se remarque en particulier lorsque l'on compare les traces représentant l'inhibition totale des courants par 1 mM de BaCl₂.

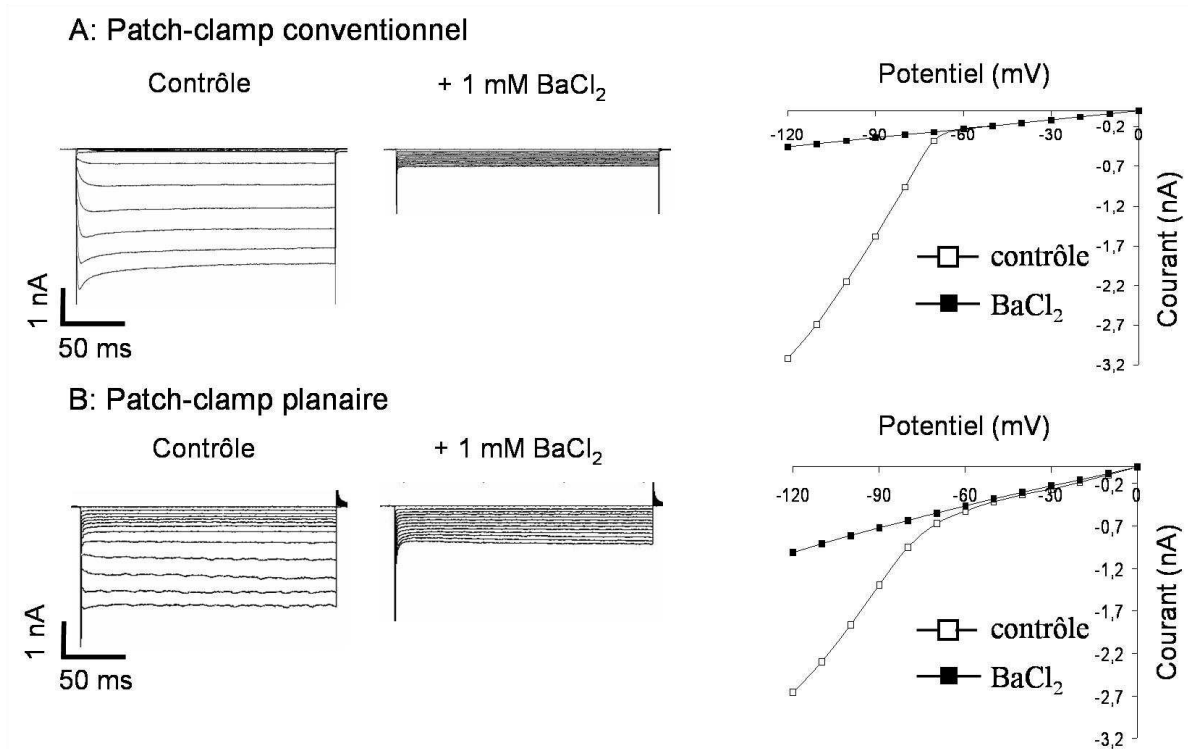


Figure 33: Courants potassiques enregistrés en cellule entière sur cellules CHO exprimant de manière stable les canaux IRK1. Ces courants rectifiants entrants ont été enregistrés en réponse à des potentiel de 0 à -120 mV (incrément de -10 mV) en patch-clamp conventionnel (A) et en patch-clamp planaire (B). La résistance de scellement est d'environ 1 GΩ pour la mesure conventionnelle et de 100 MΩ pour la mesure avec la puce silicium. Dans les deux cas l'activation des canaux est mise en évidence (traces de gauche), puis l'effet bloquant du Baryum est démontré (traces du milieu). A droite, les courbes courant-tension sont obtenues à partir des traces précédentes.

C. Discussion

1. Preuve de concept

Le dépôt supplémentaire de SiO₂ PECVD a été initié pour donner à la puce une surface plus hydrophile d'une part, et pour réduire le diamètre du trou d'autre part. Nos expériences montrent que cette couche de passivation permet d'obtenir des résistances de scellement de 155 MΩ en moyenne et atteignant jusqu'à 7 GΩ, suffisantes pour obtenir des enregistrements de qualité des courants ioniques en configuration cellule entière. L'hypothèse, selon laquelle le diamètre du microtrou est un paramètre déterminant pour la formation de scellements résistifs, semble se vérifier puisque dans un article récent Pantoja *et al* [99] reporte qu'un diamètre compris entre 1 et 2 μm est optimal pour le scellement de cellule de mammifère de la taille des CHO et les résultats préliminaires présentés ci-dessus confirment cette tendance. Toutefois, suite à cette augmentation significative des résistances de scellement, nous avons réalisé un nouveau masque permettant de graver des trous de 1.8 μm de diamètre et mené des tests sur de nouvelles puces, similaires à celles décrites dans le paragraphe A.2.1. Or, les trous de 1.8 μm de diamètre microstructurés sur la puce ne permettent pas à eux seuls d'obtenir des

scelllements supérieurs à 100 M Ω . Cette constatation indique clairement que le paramètre diamètre de l'ouverture n'est pas le seul à déterminer la qualité du scellement.

La qualité du scellement peut aussi dépendre de la déformation de la membrane cellulaire dans le microtrou, c'est-à-dire de sa capacité à s'invaginer lors de l'aspiration, et de la surface de contact qui lui est offerte. Le dépôt PECVD a permis d'augmenter la hauteur de la membrane SiO₂ (de 2 μ m à 3.5 μ m), mais a également contribué à créer des angles plus arrondis au niveau du microtrou, ce qui pourrait apporter une meilleure surface de contact pour la cellule [71]. La forme du microtrou en « sablier », que nous avons observée par MEB et modélisée de manière électrique, semble être bénéfique à la formation de scelllements stables et résistifs. Les angles vifs ont souvent été dénoncés comme empêchant la bonne formation du scellement, amenant les auteurs à recommander l'utilisation d'une surface très propre et lisse autour du microtrou [38, 71, 96].

La rugosité de la surface est elle aussi un paramètre qui a été modifié lors du procédé de dépôt du SiO₂ PECVD et dont nous ne pouvons déterminer l'influence sur le scellement de manière indépendante aux autres. Alors que plusieurs considérations qualitatives ont été avancées comme des « règles » ou des « recettes » pour obtenir de bons scelllements, aucune valeur de rugosité n'est reportée dans la plupart des études [38, 96]. Ce manque d'information vient essentiellement du manque de bibliographie sur ce sujet et de la difficulté à réaliser des études de surface sur des micropipettes de verre. Or, la majorité des publications évoquant l'influence des caractéristiques surfaciques sur la qualité du scellement utilisent des micropipettes. D'une manière générale, les recommandations vont dans le sens d'une surface peu rugueuse. Cependant, nos expériences montrent que les résistances de scellement obtenues sur des puces avec dépôt PECVD rugueux (25 Å), sont supérieures à celles obtenues sur les puces SiO₂ thermique de faible rugosité (2 Å). On peut supposer que le dépôt PECVD a une influence positive sur la formation d'un scellement résistif, la rugosité importante offrant une aire de contact plus importante à la membrane cellulaire. Enfin, le dépôt PECVD offre une surface plus hydrophile que le SiO₂ thermique, propriété qui peut également favoriser le scellement de la membrane cellulaire dans le microtrou.

Bien que la preuve de concept ait été apportée en démontrant l'enregistrement des premiers courants ioniques sur deux types cellulaires et deux modèles de canaux ioniques, les performances des puces restent encore faibles et des optimisations sont nécessaires.

2. Optimisation des performances de la puce

2.1. Vers une approche multiparamétrique

La valeur moyenne des résistances de scellement obtenue n'est en effet que de 150 M Ω , seulement 23% des scelllements sont supérieurs à 100 M Ω et 4% sont des « gigaseals ». Or notre objectif est de montrer que notre système possède les performances du patch-clamp conventionnel, c'est-à-dire qu'il permet d'obtenir au moins 50 à 60 % de « gigaseals ». La conception d'une puce apportant de tels rendements passe inévitablement par une optimisation de tous les paramètres influençant le scellement de la membrane cellulaire dans le microtrou. Or les tests préliminaires présentés dans ce chapitre ne nous permettent pas de discriminer un paramètre par rapport à un autre, puisque le dépôt PECVD que nous avons réalisé a modifié plusieurs caractéristiques à la fois, à savoir, le diamètre, la hauteur et la forme du trou, le caractère hydrophile et la rugosité de la surface. Une étude précise de l'interaction

cellule/microtrou s'impose donc pour étudier de manière systématique l'influence des différents paramètres sur la qualité du scellement. Afin de minimiser le nombre de tests à réaliser, nous avons choisi de mener cette étude en suivant un plan d'expériences. Cette démarche plus systématique devrait permettre de classer, voire de pondérer, l'influence de chaque paramètre sur la formation du scellement. Parallèlement, cette approche pourra permettre d'étudier plus précisément les interactions cellule/microtrou afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la formation du scellement.

Enfin, les caractéristiques de la suspension cellulaire jouent également un rôle déterminant dans la réussite de l'expérience. En amont du plan d'expériences, nous souhaitons mettre au point un protocole de préparation de la suspension cellulaire offrant une viabilité maximale et un nombre d'amas cellulaires minimal.

2.2. Diminution de la capacité des puces

Nous avons vu dans la partie A.2.4. du chapitre 1 que le passage en cellule entière se manifeste par l'apparition de pics capacitifs sur le signal permettant de suivre l'évolution du scellement en temps réel. La compensation de ces pics capacitifs permet ensuite de mesurer la capacité de la membrane de la cellule étudiée et donc de connaître sa taille. Cette indication est indispensable pour normaliser le courant mesuré et comparer ainsi les courants mesurés entre différentes cellules.

Or les puces que nous avons testées dans cette phase de validation possèdent des capacités encore importantes, de l'ordre de 150 à 200 pF, nettement supérieures à la capacité membranaire d'une cellule de mammifère de type CHO ou HEK (environ 10 pF). Lors du passage en cellule entière, la capacité de la membrane cellulaire est donc masquée par la capacité de la puce, et sa détermination est très délicate voire impossible.

Par ailleurs les puces présentant de fortes capacités sont très sensibles aux perturbations électriques extérieures et génèrent des bruits qui diminuent le rapport signal sur bruit de la mesure. Le chapitre 4 de ce manuscrit traitera donc de mes travaux pour réduire la capacité des puces en silicium jusqu'à une valeur proche de celle des cellules. Cette réduction de la capacité, couplée à l'amélioration de l'interaction cellule/microtrou présentée dans le chapitre 3, donnera lieu à une validation électrophysiologique plus complète sur de nouveaux canaux voltage dépendants d'intérêt sur le plan pharmacologique.

Chapitre 3 : Optimisation de l'interaction cellule/microtrou

A. Paramètres influents sur le scellement

1. Introduction

Comme nous l'avons remarqué dans le chapitre précédent, le scellement de la cellule est une étape déterminante pour enregistrer l'activité électrique de cellules, mais les conditions de sa formation restent difficiles à maîtriser et aléatoires. De nombreux paramètres du microtrou sont susceptibles d'influencer la réussite de l'expérience et il est nécessaire de mener une étude plus approfondie de l'interaction cellule/microtrou afin de fabriquer une puce donnant de nombreux scellements très résistifs. L'objectif de cette étude est de mettre au point une méthode qui permette de déterminer et de classer les paramètres d'influence sur le scellement. Cette méthode pourra servir par ailleurs de base à des travaux plus fondamentaux visant à mieux comprendre les mécanismes physicochimiques de la formation du scellement jusque là non élucidés. La complexité et le grand nombre de paramètres en cause imposent d'étudier en détail les quelques travaux sur le sujet (principalement ceux de Corey et Stevens [96] datant de 1984), basés sur des observations réalisées avec micropipettes de verre, et ensuite de les confronter aux résultats obtenus en patch-clamp planaire. Dans ce chapitre, je parlerai de « substrats » pour désigner indifféremment le verre des micropipettes ou la surface de nos puces en silicium.

2. Interactions membrane cellulaire/surface : état des connaissances

2.1. Structure du substrat

Les verres utilisés pour la fabrication des micropipettes sont très variés mais leur structure générale est similaire à celle du quartz (à laquelle celle du SiO_2 en surface de la puce peut également être assimilée). La différence entre ces verres tient à la nature et au pourcentage d'atomes supplémentaires par rapport à SiO_2 , formant des oxydes de sodium, de bore ou de plomb par exemple, qui entrent dans la composition et modifient les propriétés physicochimiques du matériau (point de fusion, caractéristiques électriques, énergie et charges de surfaces...) (Tableau 4).

	KG-33	N-51A
	wt%	
SiO_2	80	72
B_2O_3	13	12
Al_2O_3	3	7
CaO	0.1	1
MgO	-	-
Na_2O	4	6
K_2O	0.1	2
BaO	<0.1	<0.1

Tableau 4: exemple de composition de deux types de verre borosilicate. wt% : en pourcentage de masse (source: <http://www.kimble-kontes.com>).

L'étude des mécanismes d'interaction du substrat avec la membrane cellulaire passe par l'analyse des propriétés de la surface. Le verre est composé d'atomes de silicium et d'oxygène formant trois types de liaisons: des atomes d'oxygène formant un pont entre deux atomes de silicium, des groupements hydroxyles et des atomes d'oxygène chargés neutralisés par des cations comme le sodium par exemple (Figure 34). Le verre possède environ un atome d'oxygène par nm², et à titre d'exemple, dans les verres dits mous, un atome d'oxygène sur trois est chargé.

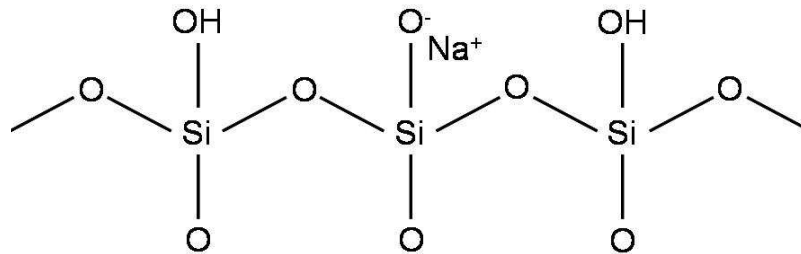


Figure 34: structure typique de la surface d'un verre contenant du sodium.

Le verre est un matériau très hydrophile, que l'eau "mouille" particulièrement bien. L'eau dissout les ions sodium à l'interface eau-verre et forme des liaisons hydrogène avec l'oxygène et les groupements OH à la surface [96].

2.2. Membrane cellulaire et notions d'adhérence

La membrane cellulaire est constituée principalement de phospholipides, chaque lipide ayant sa tête hydrophile tournée vers l'extérieur de la membrane et sa queue hydrophobe orientée vers l'intérieur. Les phospholipides possèdent une partie hydrophobe constituée de 2 chaînes d'acides gras et d'un groupement glycérol et une partie hydrophile constituée d'un phosphate chargé négativement et d'un groupe alcool en tête présentant une charge négative, positive ou neutre. L'exemple présenté dans la Figure 35 est la phosphatidylcholine, un des phospholipides présent dans les membranes cellulaires.

Bien que la structure de base de la membrane plasmique (et de toute membrane biologique) soit déterminée par la double couche lipidique, la plupart des fonctions spécifiques sont portées par les protéines. Ces protéines peuvent tout d'abord être transmembranaires, comme les canaux ioniques, les récepteurs membranaires, les pompes et tous les éléments qui maintiennent la structure de la cellule. La densité de ces protéines varie entre 100 et 10000 par μm^2 . On compte également un grand nombre de macromolécules extracellulaires sécrétées par la cellule et associées à la surface de la membrane [96]. Elles forment un réseau complexe de macromolécules extracellulaires, la matrice extracellulaire (MEC), à laquelle se lie des récepteurs

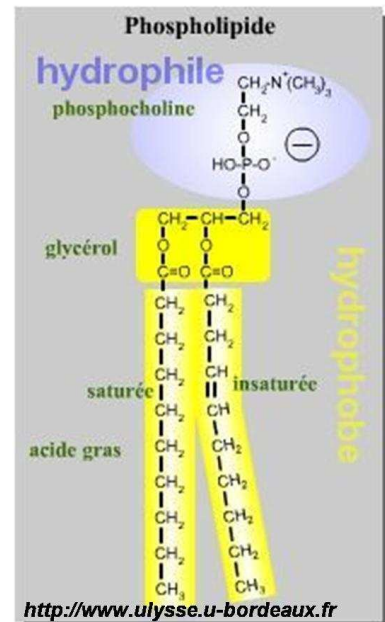


Figure 35 : exemple de la phosphatidylcholine composée d'une chaîne d'acide gras, d'un glycérol, d'un groupement phosphate et d'une choline.

transmembranaires d'adhérence. Les principales macromolécules de la MEC sont des polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycanes) et des protéines fibreuses de structure (collagènes et élastine) ou d'adhérence (fibronectine ou laminine) jouant un rôle important dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC [103]. La fibronectine est un des maillons clés de l'adhérence des cellules à la MEC, puisqu'elle présente de nombreux sites de liaisons pour des protéines de la MEC, des récepteurs membranaires (tels que les intégrines), des protéines du sang circulant et des glycosaminoglycanes [83]. Les mécanismes d'adhérence évoqués ici se mettent en place en général sur des durées de plusieurs heures [104] (cf Annexe 6).

2.3. Interaction membrane/substrat

2.3.1. Un scellement lipide/verre

La diversité des expériences de patch-clamp montre que de nombreux types cellulaires forment des scellements avec divers types de verre (le scellement peut également dépendre du type de verre, [96]). Toutes ces cellules possèdent cependant des densités et des matrices extracellulaires qui diffèrent. De plus, de nombreuses expériences, comme celles de Tank *et al* [105] et Opsahl *et al* [106], montrent que les scellements se forment de la même manière avec des vésicules lipidiques pures qu'avec des cellules. Enfin, plusieurs équipes ont mené des expériences très concluantes de patch-clamp planaire avec des vésicules lipidiques [93, 107]. Ainsi toutes ces constatations nous laissent supposer que le scellement se forme de manière directe entre le substrat et la couche bilipidique de la cellule. De plus, en patch-clamp le scellement de la membrane au substrat se réalise dans un temps généralement de l'ordre de la minute, alors que nous l'avons vu dans la partie 2.2, les mécanismes d'adhérence mettant en cause la MEC se réalisent sur plusieurs heures.

2.3.2. Espace membrane/substrat

La détermination de l'espace membrane cellulaire/substrat peut apporter des informations intéressantes sur la compréhension des interactions. En effet, cet espacement forme un canal annulaire entre la membrane et le substrat, au travers duquel le courant peut circuler. Connaissant la résistance électrique du scellement et la résistivité de la solution électrophysiologique, il devient aisé de donner un ordre de grandeur de cette distance. En effet, prenons tout d'abord le cas d'une expérience de patch-clamp avec une micropipette de verre. Corey et Stevens proposent de calculer cet espace en considérant le fragment de membrane invaginé dans la micropipette et en considérant que l'intérieur de la pointe forme un cylindre (Figure 36 A) [96].

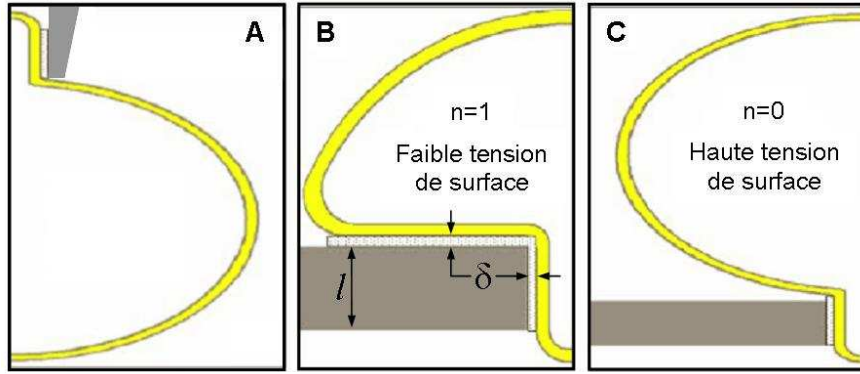


Figure 36 : calcul de l'espace δ entre la membrane cellulaire et le substrat lorsqu'un scellement très résistif est obtenu. Trois cas sont considérés. A : cas de l'utilisation d'une micropipette de verre. B : cas de l'interaction d'une cellule avec une faible tension de surface (caractérisée par l'indice $n=1$) et d'un microtrou sur un substrat plan. C : cas de l'interaction d'une cellule avec une haute tension de surface (caractérisée par l'indice $n=0$) et d'un microtrou sur un substrat plan. (Schéma inspiré de Diaz Rivera et Rubinsky [108]).

En considérant la section annulaire de l'espace membrane/substrat, noté δ , dans un pore de rayon r_{pore} , d'une hauteur l , un calcul rapide donne la valeur de la résistance de scellement R_s en fonction de la résistivité de la solution électrophysiologique:

$$R_s = \frac{\rho(l + \delta)}{\pi(2\delta r_{pore} - \delta^2)} \quad \text{Équation 7}$$

Considérons comme valeurs classiques:

$$\begin{aligned} \rho &= 1 \, \Omega \cdot \text{m} \\ r_{pore} &= 2 \, \mu\text{m} \\ l &= 4 \, \mu\text{m} \end{aligned}$$

Si la résistance de scellement R_s vaut $1 \, \text{G}\Omega$, on trouve une valeur δ de $5 \, \text{\AA}$ environ. Des scellements plus résistifs impliquent évidemment des valeurs de δ plus faibles, mais ces valeurs sont celles classiquement calculées dans la bibliographie [35, 53].

Le cas du scellement de la membrane cellulaire dans des pores sur substrat planaire est également intéressant (Figure 36 B et C). Diaz-Rivera et Rubinsky [108] ont récemment réalisé une étude de l'influence de la température sur le scellement et propose un modèle pour l'espace inter membrane/substrat décrit par les Figure 36 B et C et l'équation 7:

$$R_s = \frac{\rho(l + \delta)}{\pi(2\delta r_{pore} - \delta^2)} + \frac{\rho}{2\pi\delta} \left[\ln \left(1 - n \left[1 - \frac{r_{cell}}{r_{pore}} \right] \right) \right] \quad \text{Équation 8}$$

Ce modèle tient compte du rayon de la cellule r_{cell} d'une part et de la tension de surface de la membrane cellulaire qui agit sur l'écrasement de la cellule d'autre part. Pour une membrane avec une haute tension de surface ($n=0$) (Figure 36 C), la cellule n'est pas déformée, et à l'opposé, une faible tension de surface ($n=1$) (Figure 36 B) induit l'écrasement de la cellule qui augmente la surface de contact. En reprenant les valeurs précédemment citées, et en considérant une cellule de $15 \, \mu\text{m}$ de diamètre, on trouve une valeur δ de $15 \, \text{\AA}$ pour un

scellement de 1 G Ω dans le cas d'une faible tension de surface de la membrane cellulaire. Si une haute tension de surface de la membrane cellulaire est considérée, on retrouve le cas précédent de l'utilisation d'une micropipette. Pour une même valeur de scellement, l'espace membrane cellulaire/substrat sera plus important dans le cas $n=1$ que dans le cas $n=0$ ou de la micropipette. Ce point peut d'ailleurs constituer un des avantages du patch-clamp planaire pour permettre d'obtenir des scellements plus résistifs et de manière plus reproductible que dans le cas du patch-clamp conventionnel avec une micropipette. En effet, dans le cas $n=1$ la surface de scellement de la cellule est plus importante que dans le cas de l'utilisation d'une micropipette ; ainsi pour obtenir une même valeur de résistance de scellement un espace membrane/substrat plus grand est toléré.

Il faut tout d'abord remarquer que les valeurs de δ ont été calculées dans des cas défavorables (longueur d'invagination de la membrane importante, scellement de 1 G Ω au lieu des 20 à 200 G Ω pouvant être rencontrés), tendant à les maximiser. Par ailleurs, les calculs sont menés selon une approche macroscopique alors que les ordres de grandeurs obtenus sont atomiques. Pour ce calcul, une importante approximation est faite, puisque la longueur de Debye, de l'ordre de 10 Å dans les milieux salins, n'est pas prise en compte. Toutefois ceci nous permet de constater que l'espace entre la membrane et le substrat présente des dimensions atomiques et que les molécules d'adhérence classiques, dont la taille est en général supérieure à 1 nm voire 10 nm, ne jouent probablement pas de rôle dans ce mécanisme. Au contraire, les protéines présentes sur la surface extracellulaire de la membrane peuvent constituer des entretises défavorables à la formation du scellement [96].

2.3.3. Les interactions possibles

Compte tenu de la structure des surfaces de la membrane cellulaire et du substrat (micropipette de verre ou surface SiO₂ plane) et de la très faible épaisseur qui les sépare, quatre sources d'interactions sont possibles d'après Corey et Stevens [96]:

- des ponts ioniques entre les charges positives sur la membrane cellulaire et les charges négatives à la surface du substrat,
- des liaisons hydrogènes entre les atomes d'azote ou d'oxygène des phospholipides et les atomes d'oxygène à la surface du substrat,
- des ponts salins, formés par les cations, comme Ca²⁺ ou Mg²⁺ présents dans les solutions électrophysiologiques, entre les charges négatives de la surface du substrat et celles de la membrane cellulaire,
- des forces de van der Waals.

Le scellement semble être une conjugaison de ces quatre interactions, avec les ponts salins, les liaisons hydrogènes et les forces de van der Waals comme interactions majoritaires.

Comme nous l'avons évoqué au cours des deux premiers chapitres, les scellements de la membrane au substrat peuvent être "capricieux" et varier d'un jour à l'autre. En effet, si un jour les scellements se forment facilement et rapidement, ils peuvent ne pas se former le lendemain avec le même type de verre et de cellules. Cette constatation peut être encore une fois attribuée aux protéines de la matrice extracellulaire ou à des protéines extracellulaires qui d'une expérience à l'autre peuvent être plus ou moins présentes à la surface de la cellule et ainsi perturber différemment la formation du scellement.

3. Géométrie de l'orifice et paramètres de surface

3.1. Forme de la pipette de verre ou du microtrou

Quelques études mettent en évidence l'importance des paramètres relatifs à la micropipette de verre (ou au microtrou) tels que le diamètre de la pointe (ou du microtrou) et la longueur d'invagination de la membrane cellulaire.

Intuitivement, le diamètre de l'orifice doit être adapté à la taille de la cellule étudiée et être assez petit de manière à ne pas aspirer celle-ci entièrement dans la pipette ou le microtrou. Toutefois, il est également précisé qu'un diamètre de pore trop faible peut-être défavorable à la formation du scellement. A titre d'exemple pour des cellules de mammifères d'une dizaine de micromètres, Sakmann et Neher [53] préconisent d'utiliser des diamètres légèrement supérieurs à 1 μm pour les micropipettes de verre. De manière similaire pour le patch-clamp planaire, Pantoja *et al* [99] affirment que le diamètre du microtrou ne doit pas être inférieur à 1 μm .

Il semble qu'il existe une gamme de valeur de diamètre de pore pour laquelle le scellement se forme plus facilement. On peut supposer que ce phénomène découle d'un compromis entre la surface offerte à la membrane cellulaire pour former le scellement et les propriétés élastiques de la membrane durant l'aspiration. Ainsi pour l'étude de cellules de mammifères comme les HEK et les CHO, les micropipettes de patch-clamp ainsi que les microtrous sur les substrats plans ont en général un diamètre compris entre 1 et 3 μm .

Lors de l'aspiration, la membrane s'invagine dans le microtrou. Quelques observations microscopiques de ce phénomène dans les micropipettes de verre sont décrites dans la littérature [50, 53, 109].

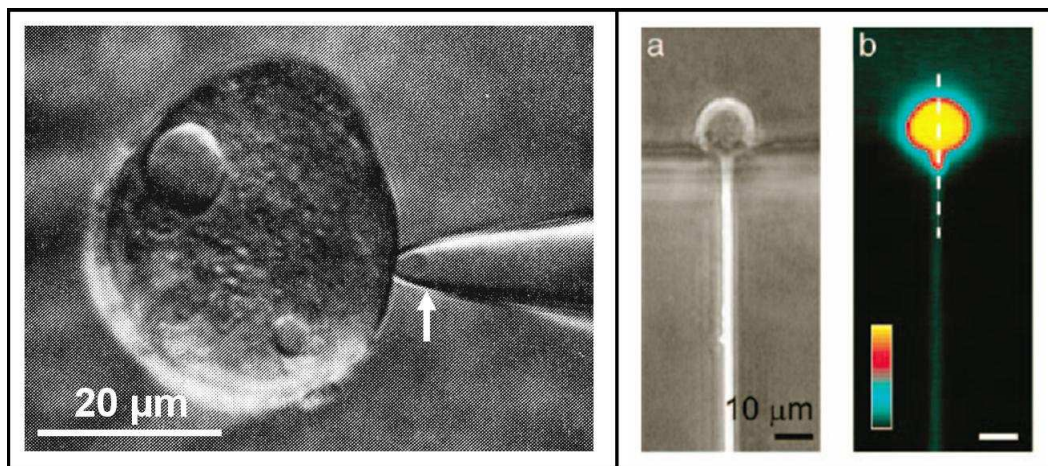


Figure 37 : invagination de la membrane cellulaire dans les orifices utilisés en patch-clamp conventionnel et planaire. Cadre de gauche : observation d'un morceau de membrane de « Myoball » de rat (cellule musculaire sphérique). La micropipette utilisée possède un diamètre de 1,9 μm , et la membrane cellulaire s'invagine jusqu'à 2,6 μm à l'intérieur de la pipette (flèche blanche). Photo extraite de Hamill *et al* [50]. Cadre de droite : observations en lumière blanche (a) et fluorescente (b) d'une cellule disposée sur le dispositif de patch-clamp transversal de Ionescu-Zanetti *et al* [92]. L'observation de la cellule CHO contenant de la calcéine, sonde fluorescente cytoplasmique, montre que la membrane s'invagine de plus de 3,3 μm dans le microcanal de 2 μm de diamètre.

La Figure 37 (à gauche) présente l'invagination de la membrane d'un « myoball » de rat (cellule musculaire sphérique) lors d'une mesure de patch-clamp conventionnel. De plus, grâce à leur dispositif de patch-clamp transverse en PDMS, Ionescu Zanetti *et al* sont capables d'observer l'invagination de la membrane cellulaire dans leur microcanal (Figure 37, cadre de droite) [92]. Qu'il s'agisse du patch-clamp conventionnel ou planaire, on remarque ainsi que la longueur d'invagination de la membrane dans un microtrou est fréquemment égale, voire supérieure au diamètre du microtrou.

Les paramètres géométriques du microtrou semblent primordiaux pour la formation du scellement de la membrane cellulaire sur le substrat mais le nombre d'études sur ce sujet reste faible et ces paramètres ne sont peu, voire pas, quantifiés.

3.2. Paramètres de surface

La nature et les caractéristiques de la surface offerte à la membrane cellulaire jouent également un rôle déterminant dans la réussite de la formation du scellement. En effet, les paramètres liés à la surface, comme la propreté, la rugosité et l'hydrophilie, sont reportés comme critiques mais aucune étude ne quantifie ces paramètres, ni ne donne d'information sur leur ordre de grandeur. Les informations qu'il est possible d'extraire de ces études ressemblent plutôt à des recommandations ou des tendances. Compte tenu de la faible distance d'interaction entre la surface et la membrane cellulaire, notre intuition nous laisse penser qu'une faible rugosité est favorable à la formation du scellement. De plus, en patch-clamp planaire, les travaux de Sigworth et Klemic sur le PDMS par exemple, montrent que les surfaces hydrophiles favorisent la formation du scellement [71, 89]. En effet, en traitant leur surface de PDMS par un plasma oxygène, ils parviennent à augmenter l'hydrophilie de la surface et à obtenir ainsi des scellements plus résistifs que sans traitement.

Enfin, une attention particulière doit être apportée à la propreté de l'échantillon. En effet en patch-clamp conventionnel, l'expérience montre que les pipettes fraîchement étirées, sous l'effet du chauffage d'un filament en tungstène, doivent être utilisées dans le temps qui suit leur fabrication de manière à augmenter les chances d'obtenir des scellements résistifs. Une hypothèse est que les pipettes conservées à l'air sont contaminées par des poussières qui empêchent ensuite la formation du scellement. Une deuxième hypothèse pourrait être que le verre fraîchement étiré possède une hydrophilie meilleure, qui se dégrade rapidement au cours du temps par modification de l'extrême surface.

3.3. Préparation cellulaire

La formation du scellement dépend des caractéristiques du substrat, mais elle dépend également fortement de la cellule, et plus particulièrement de sa forme, de sa taille et de son type. Au cours de l'expérience de patch-clamp conventionnel, l'observation des cellules par un microscope inversé (cf Chapitre 1) permet à l'expérimentateur de choisir la cellule qui sera étudiée. Grâce à des critères de sélection basés sur son expérience, il peut ainsi choisir une cellule qui a de grandes chances de former un scellement très résistif avec le verre de la micropipette. McDowell et Gray [110] proposent à ce sujet un logiciel permettant de choisir les cellules candidates parmi la population de cellules disposées dans la boîte de Pétri.

La technique du patch-clamp planaire s'affranchit du positionnement fastidieux de la micropipette, mais la phase de positionnement de la cellule sur le microtrou par aspiration ne permet pas de choisir celle qui fera l'objet de l'étude. Nous avons évoqué dans le deuxième

chapitre le fait que la concentration cellulaire était un paramètre déterminant pour le bon déroulement de l'expérience, mais un grand soin doit être apporté à la qualité de la suspension cellulaire également [87]. En effet, il s'agit d'obtenir une suspension cellulaire homogène, sans agrégats de cellules, sans poussières ou débris cellulaire. En outre, il est nécessaire de nettoyer les cellules des molécules extracellulaires qui les entourent, de manière à ce que le scellement se forme plus spontanément.

4. Approches du problème

4.1. Objectifs

Les paramètres relatifs au substrat sont déterminants pour la formation du scellement, mais comme nous l'avons spécifié, il n'existe pas à ce jour d'informations quantitatives sur les valeurs de ces paramètres. Il est donc très difficile de transposer directement les informations acquises sur les micropipettes de verre au format planaire et il est donc impossible de prédire correctement quel type de microtrou permettra d'obtenir des scellements stables et résistifs. C'est pourquoi, nous avons mis au point une étude systématique de l'influence de tous les paramètres du substrat sur la formation du scellement.

Dans un premier temps, cette étude doit nous permettre de concevoir une puce « optimale », offrant des rendements de « gigaseals » élevés, comparables à ceux obtenus en patch-clamp conventionnel. Dans un deuxième temps, grâce à ces travaux nous souhaitons être en mesure de discriminer les paramètres les plus significatifs afin de pondérer l'influence de chacun d'entre eux sur la formation du scellement. Ce point constitue un objectif important pour deux raisons majeures.

Tout d'abord cette méthodologie nous sera utile lors de la conception d'une nouvelle puce intégrant par exemple de nouvelles fonctions actives (électrodes de mesures, de positionnement, d'électromouillage...). L'ajout de telles fonctions sur la puce impose des contraintes sur les procédés de fabrication et des compromis seront à trouver de façon à satisfaire le cahier des charges imposé par chaque fonction. La connaissance de l'influence des paramètres du substrat sur la formation du scellement nous permettra ainsi de privilégier un paramètre au détriment d'un autre.

Enfin, cette étude pourra permettre d'apporter des informations plus fondamentales sur les mécanismes, non élucidés à ce jour, mis en jeu lors de la formation du scellement.

D'un point de vue pratique, nous avons bâti notre plan d'expériences sur l'étude des cinq paramètres suivants :

- diamètre du microtrou
- épaisseur de la membrane d'oxyde de silicium
- forme du microtrou
- rugosité de la surface
- hydrophilie de la surface

La formation du scellement dépend également de la cellule, et la qualité de la préparation cellulaire est un facteur déterminant. Il nous est nécessaire de mettre au point un protocole de préparation et de conservation des cellules qui assurera une qualité homogène de la suspension pendant toute la durée de l'expérience, de l'ordre de 2 à 3 heures.

4.2. Stratégie adoptée

4.2.1. Optimisation de la préparation cellulaire

Nous avons décidé d'optimiser la préparation cellulaire de manière indépendante des paramètres de la puce car cette étape est la condition première d'une expérience réussie. Afin d'obtenir une suspension cellulaire sans agrégats, nous avons réalisé des cinétiques de viabilité et de formation d'agrégats, selon différents modes de décollement des tapis cellulaires en culture et différentes techniques d'agitation.

4.2.2 Conception des puces selon un plan d'expériences

Motivations

Notre travail revient à tester 5 paramètres différents de manière indépendante, le tout en testant un minimum de puces différentes pour des raisons évidentes de coûts et de temps.

La théorie des plans d'expériences constitue une stratégie pertinente qui permet de répondre à notre besoin, puisqu'elle met en place une stratégie optimale pour recueillir un maximum d'informations d'un phénomène en un minimum de tests. Les principes généraux de cette théorie figurent en Annexe 1. Appliquons, ici, cette théorie à notre cas.

Principe du plan d'expérience

L'étude de l'influence des paramètres de la puce sur la formation du scellement peut être schématisée de la manière suivante: on s'intéresse au pourcentage de résistances de scellement supérieure à un seuil fixé, Y (appelé « réponse » dans la théorie des plans d'expériences), qui dépend d'un grand nombre de paramètres de la puce, X_1, X_2, \dots, X_5 (que nous appellerons « facteurs »). La modélisation mathématique consiste à trouver une fonction f telle que $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_5)$.

Nous supposerons dans la suite que les variables $X_i, i = 1, \dots, 5$, sont contrôlées, c'est-à-dire que nous pouvons les déterminer précisément. Nous nous intéressons à un modèle dit linéaire, c'est-à-dire un modèle du type:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_5X_5 \quad \text{Équation 9}$$

dans lequel a_0, a_1, \dots, a_5 sont des réels appelés coefficients du modèle (ici, un modèle sans interaction).

Il est important de pouvoir attribuer à chacun des facteurs deux niveaux, l'un qualifié de « niveau bas » l'autre de « niveau haut ». Si le facteur est qualitatif (comme dans le cas d'une forme de microtrou cylindrique ou en sablier) le niveau bas et le niveau haut correspondront à deux modalités du facteur. Dans la pratique, le niveau bas sera codé à l'aide du nombre -1 et le niveau haut à l'aide du nombre +1.

La matrice d'expériences est le tableau qui indique le nombre d'expériences à réaliser avec la façon de faire varier les facteurs et l'ordre dans lequel il faut réaliser les expériences. Ce tableau est donc composé de +1 et de -1. Cette matrice n'est pas construite au hasard, mais selon des critères optimaux basés sur la théorie d'Hadamard (voir Annexe 1). La détermination des coefficients est ensuite réalisée en résolvant le système d'équations obtenu en suivant les tests imposés par la matrice d'expériences.

Lors de la première étape d'un plan d'expériences, appelée « screening », on suppose, comme décrit ci-dessus, que la réponse est un modèle linéaire sans interaction, c'est-à-dire qu'elle s'écrit comme une somme de chaque paramètre étudié pondéré par un coefficient. Cette étape préliminaire ne permet généralement pas à elle seule de décrire exactement le phénomène étudié. Les étapes suivantes consistent à construire un plan d'expériences qui prend en compte les interactions (d'ordre 2 ou 3) entre les paramètres.

Pour des raisons évidentes de temps, nous avons décidé de ne pas considérer d'interactions entre les 5 paramètres et de réaliser uniquement l'étape de screening afin de discriminer les paramètres les plus influents sur la formation du scellement.

4.2.3. Caractérisations des paramètres de la puce

Les différentes caractérisations entreprises sont listées dans le Tableau 5. Les trois premières caractérisations permettent de vérifier que les puces ont les caractéristiques escomptées, alors que les deux dernières donnent des informations supplémentaires pour tenter d'apporter des explications plus fondamentales sur le phénomène du « gigaseal ».

Méthode de caractérisation	Informations recherchées	Résultats attendus
MEB	Diamètre du microtrou (et informations qualitatives sur la forme du trou)	Contrôle des caractéristiques des puces
AFM	Rugosité de la surface	
Mesure de l'angle de goutte (eau)	Hydrophilie de la surface	
Mesure de l'angle de goutte (avec 3 liquides)	Energie de surface, détermination des contributions dispersive et polaire	Comprendre le scellement
XPS	Concentration et liaisons atomiques en surface (dans les 5 premiers nm)	

Tableau 5 : présentation des caractérisations systématiques réalisées sur les puces.

B. Préparation cellulaire

1. Décollement des tapis cellulaires

Les cellules adhérentes sont cultivées en boîte de Pétri ou en flasque de culture où elles se développent en adhérant par l'intermédiaire des molécules d'adhérence de la matrice extracellulaire. Pour récupérer ces cellules, il est nécessaire de les décoller de la surface, soit par des méthodes mécaniques, soit par des méthodes enzymatiques. Les méthodes mécaniques ne sont efficaces qu'avec certains types cellulaires peu adhérents et ne permettent pas de dissocier complètement les cellules entre elles. La deuxième méthode met en jeu des enzymes qui digèrent les protéines d'adhérence et qui permettent ainsi de décoller le tapis cellulaire en dissociant également les cellules. Toutefois, les enzymes qui digèrent dans un premier temps

les protéines d'adhérence peuvent détériorer la membrane cellulaire et s'avérer délétères pour la cellule si leur action n'est pas contrôlée et stoppée dans les temps.

Nous avons évoqué dans le deuxième chapitre l'utilisation de l'accutase pour procéder au décollement des cellules dans notre phase de preuve de concept. Ce choix avait été motivé par des résultats prometteurs décrits dans la bibliographie [63] et par la diminution des amas cellulaires (nombreux lors de l'utilisation de la trypsine, enzyme la plus couramment utilisée). Lors de cette phase d'optimisation, nous avons cependant reconsidéré ce choix, ce qui a fait l'objet d'une étude comparative entre trypsine et accutase en terme de viabilité cellulaire et formation d'agrégats.

2. Optimisation du protocole de préparation de la suspension cellulaire

2.1. Différents protocoles de préparation étudiés

2.1.1. Décollement des cellules

Pour cette étude, nous avons utilisé des cellules CHO, qui feront l'objet de tous les travaux de ce chapitre. Le tapis cellulaire dans la flasque de culture est tout d'abord rincé deux fois au PBS. On laisse ensuite agir l'enzyme de décollement, la trypsine ou l'accutase pendant 3 minutes à 37°C. L'action de l'enzyme est alors inhibée par du milieu de culture pour la trypsine (inhibition par le Sérum Fœtal de Veau présent dans le milieu de culture) et par du PBS pour l'accutase. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du PBS. La viabilité des cellules dans la suspension est alors calculée, par la technique de révélation du bleu de Trypan (un marqueur de la mortalité cellulaire).

2.1.2. Dissociation des cellules

Nous avons sélectionné deux traitements pour dissocier les cellules encore en amas après l'étape de décollement. Le premier est un traitement chimique et consiste en l'ajout de 10% d'accumax dans la solution de PBS, contenant les cellules, pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues à une concentration de 1 million par mL dans du milieu électrophysiologique.

Le deuxième est une méthode physique par l'utilisation d'un tamis cellulaire (avec des mailles de 70 µm) qui permet de filtrer la suspension cellulaire et de retenir les amas de cellules. Dans ce cas, la suspension cellulaire est tout d'abord resuspendue dans du milieu électrophysiologique à la bonne concentration (1 million par mL), puis filtrée.

Le pourcentage d'amas cellulaires dans la suspension est ensuite calculé dans des « cellules de Malassez » pour chaque protocole.

2.1.3. Etude cinétique

Comme nous l'avons vu, nous souhaitons conserver les cellules, en tube Eppendorf de 1 mL ou 0,5 mL, pendant 2 à 3 heures, temps nécessaire pour tester les neuf microtrous d'une puce. Le maintien de cellules dissociées en suspension impose une agitation. Des tests préliminaires menés au laboratoire ont révélé que le carrousel est le mode d'agitation le plus efficace et le

plus respectueux de la viabilité cellulaire. Au cours de cette étude sur des suspensions cellulaires maintenues sous agitation avec un carrousel, la viabilité cellulaire ainsi que le pourcentage d'amas sont déterminés à des temps compris entre 0 et 4h30.

2.2. Résultats

Le Tableau 6 présente l'évolution de la viabilité cellulaire dans la suspension en fonction du protocole de préparation et du temps. Nous remarquons tout d'abord que la trypsine permet de décoller le tapis cellulaire avec une meilleure viabilité que l'acutase. De plus, on constate que pour les protocoles où l'accumax est utilisé, la viabilité diminue d'au moins 40% après 1h30 de conservation alors qu'avec l'utilisation du tamis cellulaire elle ne chute que de 5%. Pendant les 4h30 de cinétique, la viabilité cellulaire est relativement stable. Ainsi la meilleure viabilité cellulaire (90%) est obtenue lorsque les cellules sont d'abord décollées à l'aide de la trypsine puis filtrées sur tamis cellulaires. La deuxième méthode qui pourrait convenir, mais avec un viabilité inférieure (70%), est le décollement du tapis cellulaire avec l'acutase puis la filtration de la suspension sur tamis. Pour l'étude du nombre d'amas cellulaires nous ne retiendrons donc que ces deux méthodes.

<i>Enzyme de décollement</i>	Accutase		Trypsine	
<i>Méthode de dissociation des amas</i>	Accumax	Tamis cellulaire	Accumax	Tamis cellulaire
<i>% de viabilité avant traitement de dissociation t = 0h</i>	75 %		95 %	
<i>% de viabilité t = 1h30</i>	35%	70%	40%	90%
<i>% de viabilité t = 2h30</i>	25%	70%	40%	90%
<i>% de viabilité t = 4h30</i>	25%	70%	35%	90%

Tableau 6: viabilité cellulaire dans la suspension en fonction de la méthode de préparation cellulaire et du temps de conservation. Deux enzymes de décollement sont testées ainsi que deux méthodes de dissociation des amas cellulaires. Les pourcentages de viabilité sont donnés à $\pm 5\%$, l'erreur dépendant de la variabilité cellulaire et de la méthode de comptage manuelle.

Le Tableau 7 présente le deuxième paramètre déterminant de cette étude, le pourcentage d'amas cellulaires. Dès le décollement, l'acutase permet une meilleure dissociation des cellules, avec seulement 1% d'amas de cellule dans la suspension contre 7% avec la trypsine. On remarque que dans les deux cas ce pourcentage devient nul après la filtration sur tamis cellulaire. Le décollement du tapis cellulaire à l'acutase, suivi de la filtration, permet de conserver une suspension cellulaire sans amas durant 4h. Lors de l'utilisation de la trypsine, le pourcentage d'amas cellulaires (amas de deux cellules) augmente légèrement pour atteindre 4% au bout de 4 h d'agitation.

<i>Protocole</i>	Accutase + tamis	Trypsine + tamis
<i>% d'amas cellulaires avant filtration</i>	1%	6.5%
<i>% d'amas cellulaires après filtration $t = 0h$</i>	0%	0%
<i>% d'amas cellulaires $t = 2h$</i>	0%	2% *
<i>% d'amas cellulaires $t = 4h$</i>	0%	4% *

Tableau 7: détermination du pourcentage d'amas cellulaires dans la suspension avant filtration sur tamis puis au cours du temps. Les cellules conservées en tube Eppendorf sont agitées avec un carrousel. (*: amas constitués de 2 cellules)

3. Discussion

Les différents protocoles testés sur des cellules CHO permettent de mettre en évidence les effets néfastes de l'accutase sur la viabilité cellulaire, bien que son fabricant d'une part, et certaines études d'autre part, la reportent comme une des enzymes les plus « douces » pour les cellules (cf chapitre 2). Cependant l'utilisation de cette enzyme permet d'obtenir des pourcentages d'amas cellulaires nuls dans la suspension pendant plusieurs heures sous agitation. La méthode de dissociation des amas semble également être déterminante pour la viabilité, puisque l'accumax se révèle plus nocif que la dissociation mécanique par tamis cellulaire.

Aucun protocole testé ne permet d'obtenir une viabilité cellulaire maximale et un pourcentage d'amas minimal, mais l'utilisation de la trypsine pour le décollement du tapis cellulaire, suivie de la filtration sur tamis semble constituer un bon compromis. Avec ce protocole, la viabilité est maximale et le nombre d'agrégats reste très faible et acceptable durant les deux ou trois premières heures de conservation. Privilégiant la viabilité cellulaire par rapport à la formation d'agrégats, nous avons choisi ce protocole comme protocole de préparation de la suspension cellulaire pour la suite des tests décrits dans ce chapitre.

C. Propriétés physicochimiques du microtrou

1. Configuration de la matrice de plan d'expériences idéale

Les cinq paramètres testés prennent chacun une valeur haute (caractérisée par +1) et une valeur basse (caractérisée par -1) s'ils sont quantitatifs, et deux états s'ils sont qualitatifs (exemple, la forme du trou cylindrique ou en sablier) (Tableau 8).

Paramètre	Valeur basse = -1	Valeur haute = +1
<i>A: Diamètre microtrou</i>	1,8 μm	2,5 μm
<i>B: Epaisseur de membrane de diélectrique</i>	2 μm	7 μm
<i>C: Forme du trou</i>	cylindrique	sablier
<i>D: Rugosité</i>	quelques Å	quelques 10 ^{aines} Å
<i>E: Hydrophilie</i>	faible	haute

Tableau 8 : liste des paramètres à étudier, avec pour chacun deux valeurs ou deux états.

Dans le deuxième chapitre, nous avons vu que le diamètre du microtrou, après le dépôt de SiO₂ PECVD, avait été réduit de 2,5 à 1,7 μm . Nous avons à notre disposition deux masques de photolithographie permettant de réaliser des microtrous de 2,5 et 1,8 μm . C'est donc naturellement que nous avons choisi ces valeurs comme valeurs haute et basse pour le plan d'expériences. La valeur basse de l'épaisseur de la membrane de diélectrique a été fixée à 2 μm par analogie avec les premières puces que nous avons conçues, alors que la valeur haute a été fixée suite à des tests préliminaires qui ont montré que 7 μm était une valeur limite pour graver des microtrous de 1.8 μm de diamètre sur la hauteur totale. La forme du trou appelée cylindrique, c'est-à-dire droite, est obtenue après gravure sèche du trou et la forme dite en sablier est obtenue lorsqu'un dépôt d'oxyde est réalisé après la gravure du trou (cf chapitre 2). Sur la base de tests préliminaires qui ont montré qu'il était possible de contrôler la rugosité de la surface, nous avons réalisé des surfaces possédant seulement 2 valeurs de rugosité. Enfin, nous avons différencié les puces très hydrophiles de celles qui sont peu hydrophiles en réalisant ou non un traitement plasma oxygène sur leur surface.

La liste des paramètres décrits dans le Tableau 8, possédant chacun deux niveaux, nous a conduit à une matrice d'expériences qui est présentée dans le Tableau 9.

Nous pouvons constater dans ce tableau qu'il est nécessaire de concevoir 8 types de puce différents, puisque les puces des essais 1 et 2, 3 et 4, 5 et 6, etc... ne diffèrent pas par leur caractéristiques physiques mais uniquement par leur hydrophilie de surface qui est contrôlée par un traitement plasma oxygène de la surface réalisé juste avant le test de la puce.

N° puce	N° essai	Facteurs contrôlés				
		A	B	C	D	E
1	1	-1	-1	-1	-1	-1
	2	-1	-1	-1	-1	+1
2	3	-1	-1	-1	+1	-1
	4	-1	-1	-1	+1	+1
3	5	-1	+1	+1	-1	-1
	6	-1	+1	+1	-1	+1
4	7	-1	+1	+1	+1	-1
	8	-1	+1	+1	+1	+1
5	9	+1	-1	+1	-1	-1
	10	+1	-1	+1	-1	+1
6	11	+1	-1	+1	+1	-1
	12	+1	-1	+1	+1	+1
7	13	+1	+1	-1	-1	-1
	14	+1	+1	-1	-1	+1
8	15	+1	+1	-1	+1	-1
	16	+1	+1	-1	+1	+1

Tableau 9 : matrice d'expériences définissant les différents types de puce à fabriquer et tester.

2. Mise en œuvre d'une matrice d'expériences simplifiée

2.1. Choix technologiques

Le principe de conception des puces est le même que celui décrit dans le chapitre 2, seules les épaisseurs et les méthodes de dépôt des diélectriques varient (le détail des divers procédés se trouve en Annexe 2). Dans cette partie, je souhaite mettre l'accent sur les solutions apportées aux difficultés technologiques imposées par la matrice d'expériences.

2.1.1. Epaisseur de diélectrique

La première difficulté est la réalisation de couche d'oxyde de 7 μm d'épaisseur. En effet dans le chapitre 2, les puces utilisées possèdent une épaisseur de 2 μm de SiO_2 thermique. Cette valeur constitue déjà une limite pour ce mode de croissance d'oxyde et il n'est pas envisageable d'utiliser la même méthode pour obtenir une épaisseur de 7 μm . Nous nous sommes ainsi tournés vers un dépôt de SiO_2 PECVD TEOS (Tetraethyl Orthosilicate), qui permet d'obtenir des épaisseurs d'oxyde de plusieurs micromètres avec des rugosités de surface très faibles par rapport à des dépôts de SiO_2 PECVD par exemple.

2.1.2. Gravure de microtrous à fort rapport d'aspect

Le plan d'expérience impose la réalisation de trous de 2,5 et 1,8 μm de diamètre dans des épaisseurs d'oxyde de 2 et 7 μm . La gravure des microtrous dans la couche de diélectrique sur

une profondeur de 7 μm nécessite des temps de gravure très importants. Il en résulte un risque d'attaque de la couche de protection servant de masque. Ceci a pour effet de réaliser des gravures de plus grande taille que prévue. Afin de limiter ce risque, nous avons utilisé un masque de silicium amorphe, matériau connu pour mieux résister à la gravure RIE que la plupart des autres matériaux utilisés comme masque de gravure.

2.1.3. Forme du trou

La forme du trou est dite cylindrique ou en sablier. La forme cylindrique, c'est-à-dire droite, est obtenue après gravure du microtrou. Un dépôt supplémentaire d'oxyde après la gravure permet de réduire le diamètre du microtrou et de lui donner une forme arrondie que nous avons caractérisée dans le chapitre 2 et définie comme un sablier. Il est cependant difficile de contrôler et de caractériser exactement la forme du sablier ce qui nous oblige à ne considérer que deux états : forme cylindrique et forme en sablier.

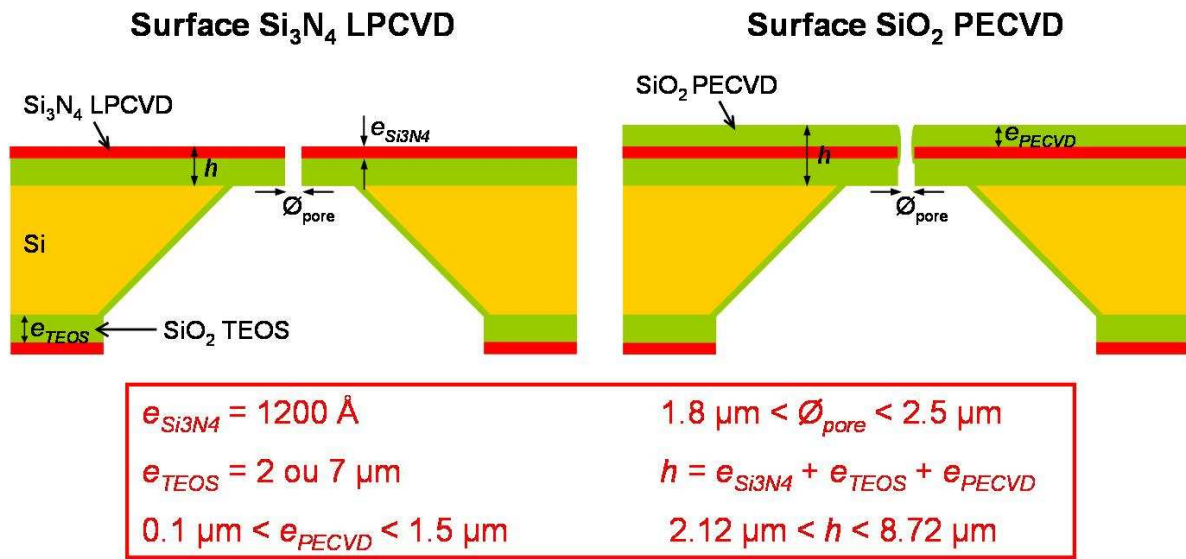
2.1.4. Rugosité

Il est nécessaire de réaliser les 8 types de puces avec seulement 2 valeurs de rugosité, par exemple quelques Angström et quelques dizaines d'Angström. Pour des épaisseurs allant de 2 à 7 μm , des mesures préliminaires nous ont montré que les couches d'oxyde TEOS présentent une faible rugosité rms (root mean square), inférieure à 10 Å. Pour obtenir une rugosité plus importante, de l'ordre de 50 Å, nous réalisons un dépôt de 1 μm de SiO_2 PECVD par exemple, par-dessus la couche de faible rugosité décrite précédemment.

2.2. Conséquences des problèmes rencontrés sur le plan d'expériences

Lors de la réalisation des puces, malgré des tests préliminaires et l'utilisation de silicium amorphe comme couche protectrice, la gravure des microtrous de 2,5 μm et 1,8 μm de diamètre a été plus importante que prévue. Nous avons en effet obtenu des microtrous dont le diamètre était de 3,5 μm et de 2,5 μm respectivement, donc plus large de 1 μm . Ne pouvant solutionner suffisamment rapidement le problème par la fabrication d'un nouveau lot de puces, nous avons décidé de diminuer le diamètre des trous à la valeur initialement souhaitée en déposant une couche de SiO_2 PECVD supplémentaire, à l'instar de ce que nous avons réalisé pour les puces décrites dans le chapitre 2. Ce dépôt de SiO_2 PECVD pratiqué sur presque la totalité des puces confère systématiquement une forme en sablier au microtrou, ce qui nous a obligés à retirer le paramètre « forme du trou » du plan d'expérience. Cependant nous avons réintroduit un paramètre supplémentaire à la place qui est « le matériau » en surface. En effet, à ce stade de la fabrication nous possédions deux types de matériau en surface, le nitrure de silicium et le dioxyde de silicium. Ces aléas ont donc une influence sur la matrice d'expériences qui se voit fortement modifiée et donnent lieu à une matrice d'expériences simplifiée.

Nous disposons ainsi de puces avec une surface en Si_3N_4 LPCVD et de puces avec un dépôt de SiO_2 PECVD. En faisant varier l'épaisseur des différentes couches et en particulier l'épaisseur de la couche initiale de SiO_2 TEOS (2 et 7 μm), nous avons réalisé 6 types de puces différents dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau de la Figure 38 conformément à la matrice simplifiée.



Facteur	Puce	P1	P2	P3	P4	P5	P6
$\varnothing_{\text{pore}} (\mu\text{m})$		1.8	1.8	1.8	1.8	2.5	2.5
$h (\mu\text{m})$		2.12	2.22	3.82	8.62	8.62	8.72
Matériau		Si_3N_4	SiO_2	SiO_2	SiO_2	SiO_2	Si_3N_4
Rugosité souhaitée		faible	faible	haute	haute	haute	haute
Hydrophilie souhaitée		faible	faible	faible	faible	faible	faible
Hydrophilie souhaitée après plasma O_2		haute	haute	haute	haute	haute	haute

Figure 38 : Présentation des puces conçues pour l'étude de l'interaction cellule/microtrou. En haut : structure générale des puces comportant soit une surface Si_3N_4 LPCVD, soit une surface SiO_2 PECVD. Au milieu : valeur des diamètres de trou et des différentes épaisseurs de diélectrique. En bas : tableau résumant les 6 types de puces fabriquées.

2.3. Préparation des puces

Après leur découpe et avant leur utilisation avec des cellules, les puces sont nettoyées au Caro. Notons qu'un nombre de nettoyage inférieur à 3 Caro ne permet pas d'avoir des mesures de résistance du microtrou (sans cellules) reproductibles (cf chapitre 2). Les puces traitées au plasma oxygène sont testées dans les deux à trois heures qui suivent le traitement, période pendant laquelle les propriétés de surface (hydrophilie) restent stables.

3. Caractérisations des puces

3.1. Principes des outils de caractérisation

3.1.1. Microscopie Electronique à Balayage

Le diamètre des microtrous a été mesuré par MEB. Malgré la forte épaisseur de certaines couches de diélectriques sur les puces, les effets de charges à la surface n'étaient pas rédhibitoires ; il n'a donc pas été nécessaire de déposer une couche conductrice, de type dépôt d'or, sur la surface.

3.1.2. Microscopie à Force Atomique

La rugosité des puces est mesurée par AFM en mode contact (PicoPlus de Molecular Imaging). L'analyse est réalisée sur une aire de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ et la valeur moyenne rms de la rugosité est calculée par le logiciel d'analyse WSxM.

3.1.3. Analyse atomique de la surface : spectroscopie de photoélectron X

Choix de la technique d'analyse

Pour étudier la composition chimique d'une surface, il existe de multiples techniques expérimentales regroupées sous le terme général d'analyses de surface. Les informations obtenues par une analyse de surface proviennent d'une couche superficielle du solide dont l'épaisseur dépend de la technique et du matériau. Cette épaisseur de l'ordre de quelques nanomètres est appelée profondeur d'analyse. La surface au sens physico-chimique possède donc une épaisseur (différent de la notion de surface au sens mathématique).

Rappelons que notre souhait est de déterminer la composition à l'extrême surface de nos puces pour espérer obtenir des éléments d'informations permettant de mieux comprendre l'interaction de la cellule avec le microtrou. La technique d'analyse de surface que nous avons exploitée est la spectroscopie de photoélectrons X ou XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), ou encore ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis). Cette méthode renseigne sur la nature des atomes et des liaisons chimiques et possède une des plus faibles profondeurs d'analyse, de l'ordre de 5 nm. L'instrument de mesure étant disponible dans le centre du CEA Grenoble, nous avons réalisé notre analyse de surface au Département Plate-forme Technologique Silicium.

Principe physique

Toutes les analyses de surface reposent sur le même principe. L'échantillon, excité par des électrons, des ions ou une radiation électromagnétique (constituée de photons), émet d'autres particules que l'on analyse en énergie ou en masse. Le spectre d'énergie ou de masse obtenu fournit alors les informations sur la composition de la surface. Dans le cas de la spectroscopie XPS, la surface est excitée par un rayonnement X et on analyse en énergie les électrons émis par l'échantillon (Figure 39). Ces électrons issus d'un processus de photo-émission sont qualifiés de photoélectrons. La mise en oeuvre de la spectroscopie XPS nécessite de travailler sous ultra-vide (pression de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} mbar) pour permettre le fonctionnement de la source X et de l'analyseur mais également pour limiter l'adsorption de molécules polluantes (H_2O , O_2 , CO_2 ...) sur la surface à analyser.

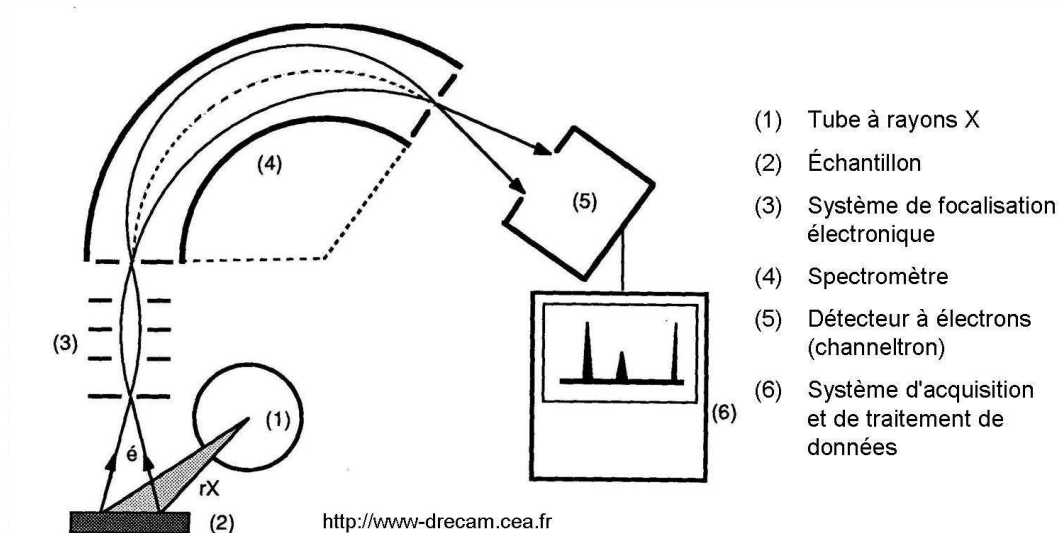


Figure 39 : Schéma de principe d'un ensemble de spectrométrie de photoélectrons X. L'analyseur (4), qui permet une sélection en énergie des photoélectrons, est constitué de deux électrodes hémisphériques. La différence de potentiel entre ces deux électrodes définit l'énergie de passage des électrons. Seuls les électrons ayant une énergie cinétique comprise dans un intervalle d'énergie centré sur cette énergie de passage arriveront au détecteur. A la sortie de l'analyseur se trouve donc un détecteur multiplicateur de type « channeltron » (5) qui permet de créer des électrons secondaires

Chaque photon constituant la radiation monochromatique X de fréquence ν a pour énergie : $E_x = h\nu$, ($h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s) est la constante de Planck.

Le photon, lorsqu'il interagit avec un atome de la cible, peut provoquer son ionisation en lui cédant la totalité de son énergie E_x . Une partie de cette énergie sert à arracher l'électron à l'atome; il s'agit de l'énergie de liaison E_L . Le reste est transmis à l'électron sous forme d'énergie cinétique : $E_0 = E_x - E_L$ (Figure 40). L'électron qui atteint l'extrême surface du solide avec cette énergie E_0 est émis dans le vide. Il atteindra l'analyseur (ou spectromètre) avec une énergie cinétique $E_c = E_0 - W$. Le travail de sortie W du spectromètre, évalué par étalonnage, est la conséquence d'une différence de potentiel électrique entre l'échantillon et l'analyseur.

L'énergie cinétique E_c mesurée par le spectromètre permet d'accéder à l'énergie de liaison E_L caractéristique du niveau électronique (couche et sous-couche) dont le photoélectron est issu: $E_L = h\nu - E_c - W$, et par conséquent à la nature de l'atome et à son environnement chimique.

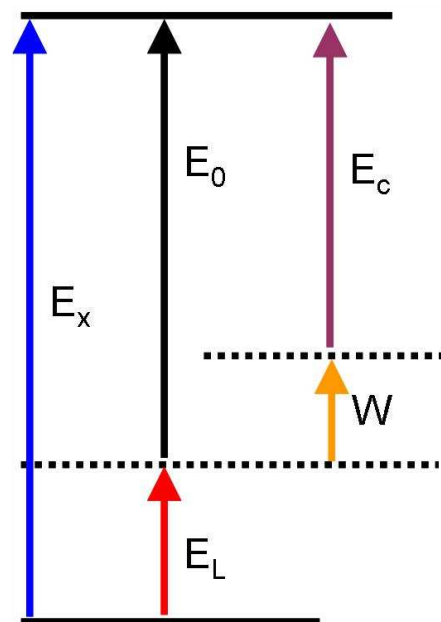


Figure 40 : diagramme énergétique du processus de photoémission.

Lors de l'analyse d'un échantillon, on obtient dans un premier temps le spectre global basse résolution, représentant l'énergie cinétique (ou l'énergie de liaison) en fonction du nombre d'électron compté. Il apparaît alors des pics dont l'énergie est caractéristique d'un type d'électron, sur lesquels des analyses haute résolution sont pratiquées dans un second temps.

Principe expérimental

L'analyse d'échantillon présentant une surface d'isolant est très délicate et quelquefois impossible en XPS. En effet les effets de charges (accumulation de charges positives à la surface) décalent les pics d'énergie dans les spectres, rendant l'interprétation difficile voire impossible. Afin de limiter ce risque, nous n'avons pas directement étudié nos puces, qui présentent des épaisseurs d'oxyde beaucoup trop importantes, mais des échantillons comportant uniquement des dépôts de 100 nm de Si_3N_4 LPCVD et de 100 nm de SiO_2 PECVD (conditions de dépôt similaires à celles utilisées pour la fabrication des puces).

Les analyses en XPS ont été effectuées avec source X $\text{AlK}\alpha$ monochromatique à 1486,6 eV, sur une profondeur sondée typique de 5 nm, pour des couches de SiO_2 et Si_3N_4 utilisées pour la réalisation de puces.

3.1.4. Mesures d'énergie de surface: méthode des angles de contact

Principe physique

Lorsqu'un liquide entre en contact avec une surface (ou un autre liquide non miscible), un grand nombre de forces microscopiques agissent et permettent ou non sa mouillabilité sur la surface. Ces forces sont notamment les forces de van der Waals, ou forces dispersives, créées par la délocalisation des nuages d'électrons des deux protagonistes, et les forces d'origine polaire qui regroupent les forces électrostatiques (électronégativité des atomes) faisant intervenir d'éventuelles charges à leur surface, et les liaisons hydrogène. Les forces dispersives existent dans tous les atomes; par contre, toutes les molécules ne sont pas polaires. La potentialité de ces forces peut être quantifiée par des valeurs macroscopiques, les énergies de surface (qui s'expriment en mN.m^{-1} ou en mJ.m^{-2}). L'angle de contact entre le liquide et la surface dépend, outre d'autres effets comme la rugosité de la surface, des énergies de surface respectives des protagonistes. L'équation de Young permet d'établir une relation entre l'angle de contact d'un liquide sur un substrat (Figure 41), noté θ , leurs énergies de surface respectives σ_L et σ_S , et l'énergie interfaciale γ_{SL} (énergie du contact) :

$$\sigma_S = \gamma_{SL} + \sigma_L \cos \theta \quad \text{Équation 10}$$

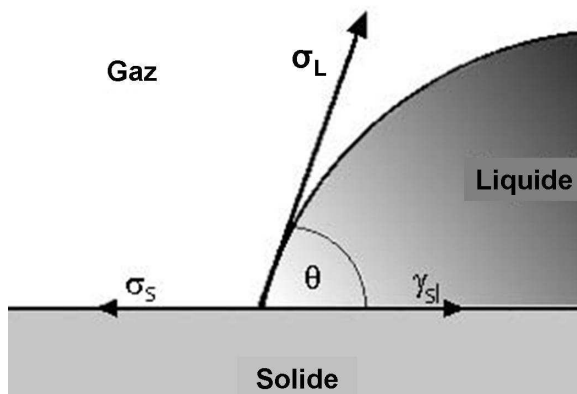


Figure 41 : Formation d'un angle de contact sur une surface solide, d'après Young.

Les énergies de surface du liquide (tension superficielle) ou celles du substrat sont la somme de leurs composantes dispersives (σ^d) et polaires (σ^p). Plusieurs modèles permettent d'estimer ces composantes par le calcul. Comme la grande majorité des modèles, ils parviennent à reproduire une certaine réalité physique dans un intervalle de paramètres bien définis; en dehors de leur intervalle de fonctionnement, ils peuvent diverger fortement de la réalité.

Fowkes a montré qu'une substance purement dispersive peut interagir avec la fraction dispersive de la substance avec laquelle elle est en contact [111]. Owens & Wendt ont considéré que les surfaces pouvaient avoir une fraction dispersive et une fraction polaire [112]:

$$\sigma = \sigma^d + \sigma^p \quad \text{Équation 11}$$

Pour déterminer l'énergie de surface d'un substrat à partir de l'angle de contact qu'il a avec un liquide dont on connaît l'énergie de surface, il faut calculer l'énergie interfaciale (γ_{SL}). D'après Dupré, la relation qui unit les énergies de surface des deux protagonistes et l'énergie interfaciale, est un travail, le travail d'adhésion (qui s'exprime comme une énergie de surface) [113]:

$$W_{SL} = \sigma_L + \sigma_S - \gamma_{SL} \quad \text{Équation 12}$$

Le travail d'adhésion d'un liquide sur un substrat se calcule à partir de la moyenne géométrique entre l'énergie de surface d'un substrat et celle d'un liquide [111, 114]. Donc $W_{SL} = 2\sqrt{\sigma_S \sigma_L}$ d'où après développement et en accord avec l'équation 11,

$$W_{SL} = 2\left(\sqrt{\sigma_S^d \sigma_L^d} + \sqrt{\sigma_S^p \sigma_L^p}\right) \quad \text{Équation 13}$$

en admettant que seules les interactions d'un même type subsistent (ex: dispersives-dispersives), c'est-à-dire que seuls les travaux d'un même type existent :

$$W_{SL} = W_{SL}^d + W_{SL}^p \quad \text{Équation 14}$$

Après combinaison des équations 10, 12 et 13, on obtient la relation suivante, qui correspond à l'équation utilisée pour les méthodes de Fowkes et Owens & Wendt :

$$\sigma_L(1 + \cos \theta) - 2\left(\sqrt{\sigma_S^d \sigma_L^d} + \sqrt{\sigma_S^p \sigma_L^p}\right) = 0 \quad \text{Équation 15}$$

Les méthodes de Fowkes et Owens & Wendt font partie d'une même famille dans laquelle le travail d'adhésion correspond à la moyenne géométrique des tensions de surface particulières (composantes). Ces méthodes répondent à un champ important de valeurs d'énergies de surfaces. La différence entre les méthodes de Fowkes et d'Owens & Wendt repose sur le mode de calcul: la méthode d'Owens & Wendt utilise une régression linéaire pour résoudre le système d'équation, tandis que la méthode de Fowkes fonctionne par déterminations successives des composantes avec des liquides permettant d'exclure certaines composantes à chaque étape du calcul (détail des calculs en Annexe 3).

Principe expérimental

On cherche à déterminer les composantes de l'énergie de surface d'un substrat à partir de celles connues de 3 liquides différents et des angles de contacts qu'ils forment avec le substrat.

J'ai choisi de calculer l'énergie de surface selon la méthode d'Owens & Wendt. Pour cela, j'ai utilisé les 3 liquides suivants :

- un liquide purement dispersif, le diiodométhane,
- un liquide n'ayant pas de contribution électrostatique, mais ayant une contribution des liaisons hydrogène non nulle, l'éthylène glycol,
- un liquide dont les trois contributions sont supérieures à 0, par exemple l'eau.

Les trois mesures ainsi réalisées permettent de tracer une droite dont l'ordonnée à l'origine correspond à l'énergie de surface dispersive et dont la pente donne l'énergie de surface polaire (détail de la résolution en Annexe 3).

Pour les mesures d'angle de contact, j'ai utilisé un appareil de mesure d'angle de contact de la société Krüss, le DSA 10, disponible au Département Optronique du CEA Grenoble. Cet appareil semi-automatique permet de dispenser sur la surface des gouttes de volume fixe (1 μL) et d'analyser l'angle de contact à un temps précis après la dépose (2 secondes) de manière à obtenir des mesures reproductibles et comparables. Le logiciel associé m'a permis de calculer rapidement les énergies de surfaces de mes divers échantillons suivant la méthode d'Owens & Wendt.

3.2. Résultats

3.2.1. Détermination du diamètre des microtrous

Les mesures sont résumées dans la Figure 42 ci-dessous. Les diamètres des microtrous sont conformes aux valeurs fixées et l'erreur est en général de 0,1 μm .

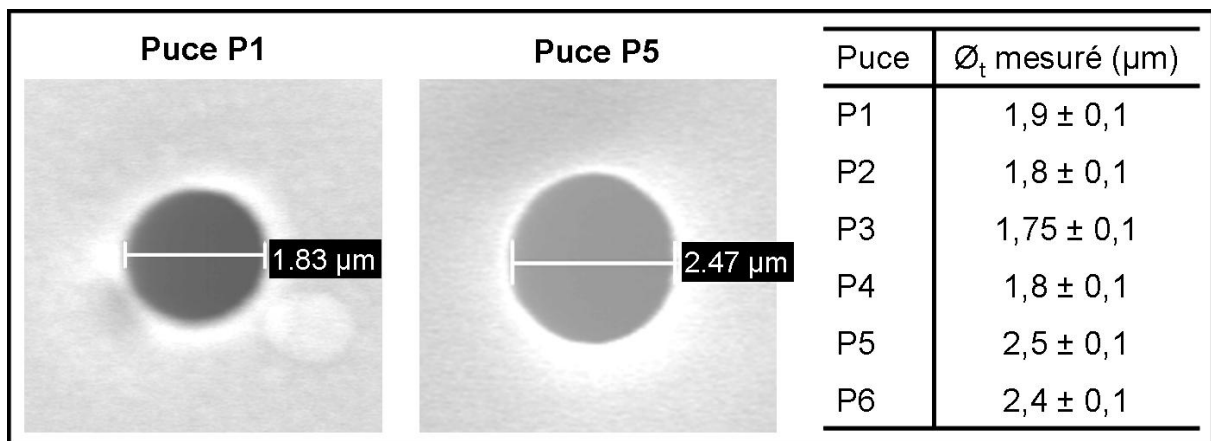


Figure 42 : détermination du diamètre des microtrous par observations MEB. Photos : exemple des puces P1 et P5, possédant respectivement des diamètres de 1,83 et 2,47 μm . Le tableau sur la droite résume les valeurs des diamètres des microtrous des six types de puces.

3.2.2. Détermination de la rugosité

Les résultats sont présentés dans la Figure 43. Nous obtenons les deux types de rugosités attendus.

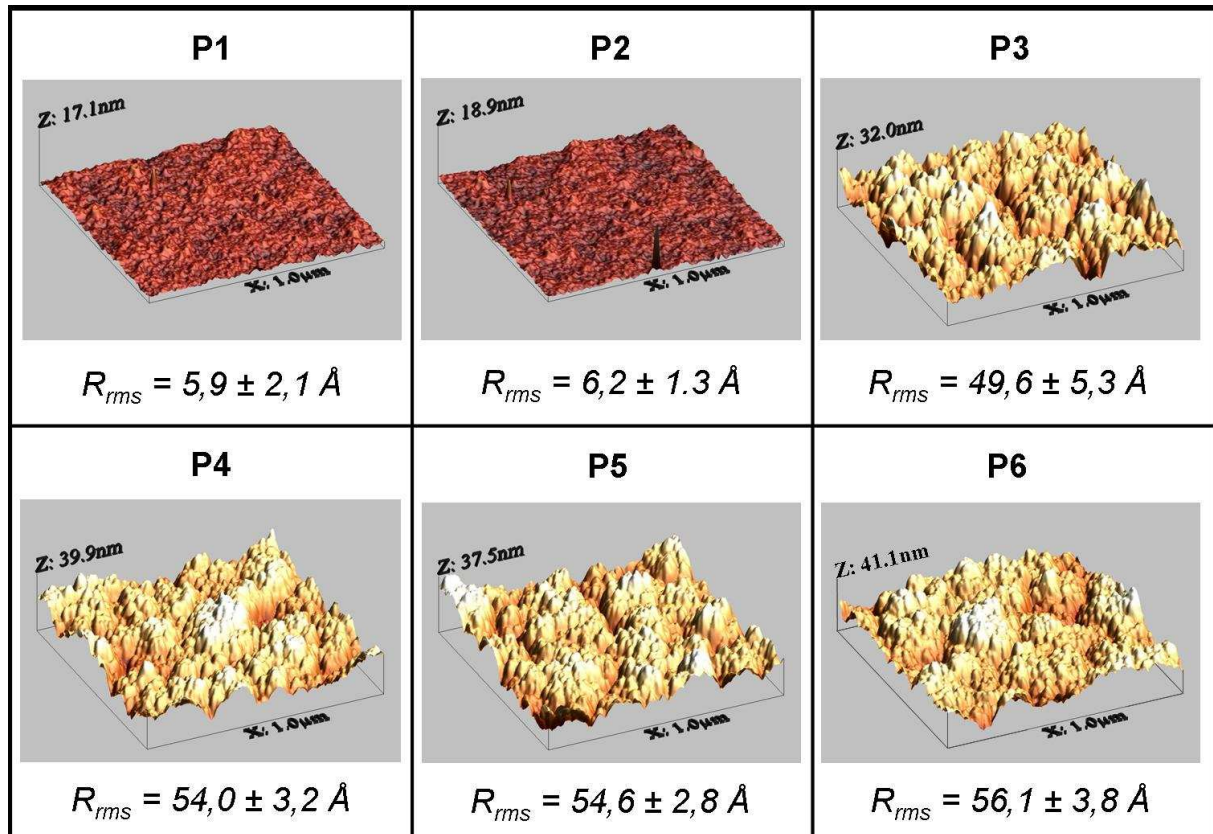


Figure 43 : Détermination de la rugosité de chaque type de puce. Calcul de la valeur moyenne rms de la rugosité avec le logiciel WSxM sur une aire de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$.

Les rugosités les plus faibles sont de l'ordre de 5 \AA ($\pm 2 \text{ \AA}$) et sont obtenues sur les surfaces ne comportant pas un dépôt important de SiO_2 PECVD : sur la puce P1 ne comportant pas de dépôt supplémentaire de SiO_2 PECVD et sur la puce P2 comportant un dépôt de $0,1 \mu\text{m}$. Les puces P3 à P6 présentant un dépôt épais de SiO_2 PECVD (supérieur à $1 \mu\text{m}$) ont une rugosité moyenne rms de l'ordre de 50 à 55 \AA . La surgravure des microtrous nous a obligés à déposer une nouvelle couche de SiO_2 PECVD sur la surface des puces P3 à P6 pour diminuer leur diamètre à la valeur souhaitée initialement. Or, ce dépôt supplémentaire a engendré une rugosité importante sur la surface et a contribué à augmenter l'épaisseur de la membrane de diélectrique. Ce résultat montre une limite du plan d'expériences, puisque épaisseur de la membrane de diélectrique et rugosité de la surface sont en fait corrélées.

3.2.3. Composition atomique de surface

Conformément à nos attentes, les spectres XPS généraux basse résolution énergétique (Figure 44) ne mettent en évidence aucun élément autre que Si, O, N, et C. Le carbone détecté, ainsi qu'une partie de l'oxygène, proviennent de la contamination naturelle de surface occasionnée par l'exposition de l'échantillon à l'air ambiant. L'importance de cette contamination, variable suivant la nature chimique de la surface et le traitement reçu, est appréciée par la concentration atomique de surface du carbone.

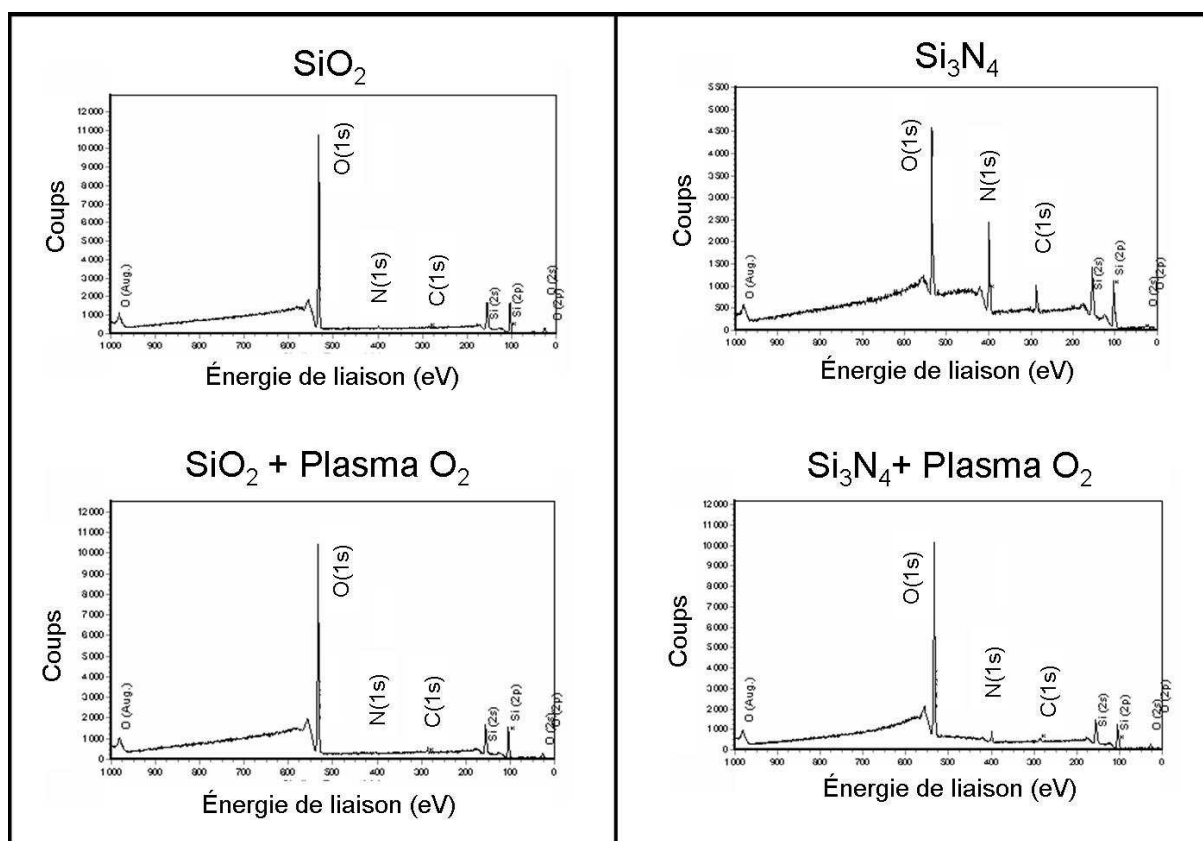


Figure 44 : Spectres généraux XPS des quatre types de surfaces : SiO_2 , SiO_2 avec traitement plasma O_2 , Si_3N_4 , et Si_3N_4 après plasma O_2 .

Le Tableau 10 résume la composition élémentaire en surface des échantillons, donnée avec une précision de 15%, ainsi que les états de liaison présents. La concentration des différents éléments est calculée à partir de l'intensité intégrale des spectres XPS des niveaux de coeurs, mesurés à haute résolution en énergie (exemple des spectres $\text{Si}(2p)$ en Figure 45).

Echantillon	%Si	%O	%C	%N	Etats de liaisons présents
SiO_2	30.9	65.1	2.5	1.5	Si-O, C-H, C-C, C-O, Si-N(-H ₂)
SiO_2 + Pl O_2	29.3	66.2	3.9	0.6	Si-O, C-H, C-C, C-O, Si-N(-O ₂)
Si_3N_4	31.8	31.9	9.4	26.9	Si-O, C-H, C-C, C-O, N(-Si ₃)
Si_3N_4 + Pl O_2	29.5	61.2	4.8	4.5	Si-O, C-H, C-C, C-O, N(-Si ₃)

Tableau 10 : composition élémentaire et états de liaison en surface des 4 différentes surfaces de puce (déterminés à partir des spectres haute résolution).

Pour les couches de SiO_2 , on constate une présence significative (compte tenu de la précision de la mesure) d'azote en surface. Cet azote est, d'après les énergies de liaison en jeu sur les spectres $\text{N}(1s)$ haute résolution (non montrés), dans un état de liaison qui implique à la fois Si

et H pour les échantillons SiO_2 ; il possède des atomes oxygène en premiers voisins après traitement plasma. La concentration atomique en azote varie significativement d'un échantillon à l'autre. La contamination carbonée sur les deux échantillons (SiO_2 et SiO_2 avec plasma O_2) varie tout en restant faible. Enfin, le rapport O/Si mesuré est proche de 2, comme attendu pour de la silice (l'excès d'oxygène étant imputable à la contamination de surface).

Pour les couches de Si_3N_4 , la quantité d'oxygène en surface est très importante ; cet oxygène est lié en partie au silicium comme l'attestent les spectres haute résolution Si(2p) (Figure 45), et d'autant plus après un traitement plasma oxygène. Sur les 5 nm sondés, les couches de nitrure de silicium comportent donc, après le traitement plasma O_2 , de la silice qui est majoritaire. La quantité d'azote observée est largement inférieure à celle attendue pour un nitrure stoechiométrique, déjà avant traitement (en effet, une partie du Si est liée à O, d'après les spectres Si(2p)). Cette sous-stœchiométrie vient probablement de l'oxydation de la couche de nitrure pendant les trois nettoyages Caro qu'ont subis les puces avant l'étude. La quantité d'azote chute de façon spectaculaire après un plasma oxygène ; on constate alors un renversement de tendance sur le spectre Si(2p) (Figure 45).

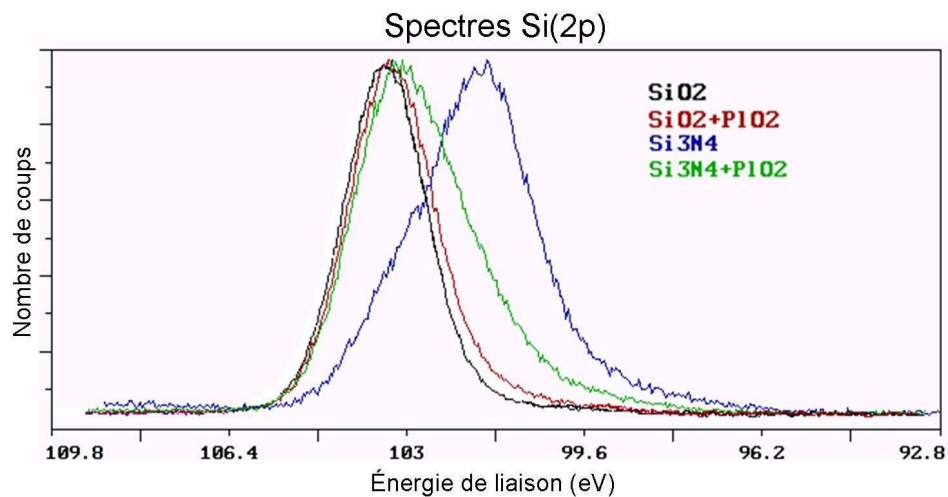


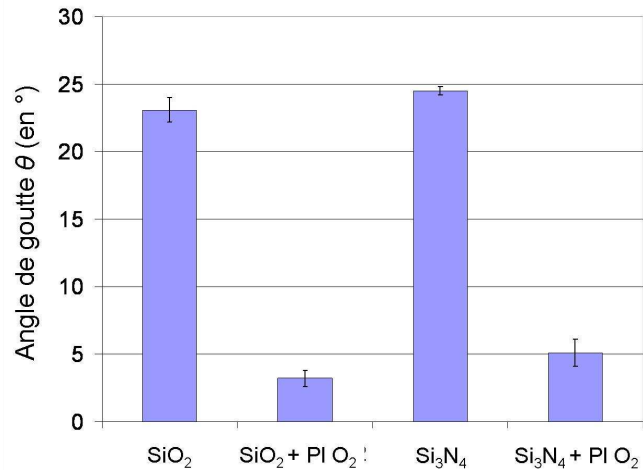
Figure 45 : spectres haute résolution au niveau du pic Si(2p). Après le traitement plasma oxygène l'énergie de liaison mesurée pour la surface Si_3N_4 se rapproche de celle mesurée pour la surface SiO_2 .

En conclusion, les couches de silice analysées apparaissent bien stoechiométriques, mais d'un échantillon à l'autre, la contamination naturelle en carbone varie de façon significative, et une présence d'azote systématique est observée, qui varie suivant le traitement. Les spectres haute résolution N(1s) permettent de déterminer les états de liaison en jeu, hydrogénés et/ou oxydés, dans des liaisons incluant le silicium. Les couches de nitrure sont largement sous-stœchiométriques en azote dès le dépôt, ceci étant dû à l'oxydation apportée pour les nettoyages successifs au Caro. Après traitement plasma oxygène, il ne reste vraisemblablement qu'une couche de silice en surface. En terme de concentration atomique, cela signifie qu'après un traitement plasma oxygène les surfaces SiO_2 et Si_3N_4 de nos puces sont équivalentes.

3.2.4. Hydrophilie et mesures d'énergies de surface

Les mesures d'angle de contact avec une goutte d'eau permettent de caractériser l'hydrophilie des différentes surfaces. La Figure 46 présente les valeurs d'angle de gouttes sur les 4 types de surface : dioxyde de silicium avec et sans traitement plasma oxygène et nitrure de silicium avec ou sans plasma oxygène.

Figure 46 : valeurs d'angle de gouttes sur les surfaces de dioxyde de silicium et de nitrure de silicium, avec ou sans traitement plasma oxygène.



Les valeurs présentées sont des valeurs moyennes sur 5 mesures au minimum. On remarque que pour les deux types de surface (SiO_2 et Si_3N_4), le plasma oxygène diminue fortement l'angle de contact, de 23 à 3° pour le SiO_2 par exemple. Par ailleurs, le dioxyde de silicium est légèrement plus hydrophile que le nitrure de silicium.

Sur les quatre types de surface, la mesure des angles de contact que font deux autres liquides, le diiodométhane et l'éthylène glycol, permet de calculer leur énergie de surface. Sur la Figure 47, on constate que le traitement plasma oxygène augmente fortement l'énergie de surface des deux matériaux SiO_2 et Si_3N_4 , de 63 à 68 mN/m pour la silice par exemple. Nous avons vu lors du principe de calcul des énergies de surface qu'il était possible de calculer les contributions polaires et dispersives suivant le modèle de Owens & Wendt. Les deux graphiques (en bas) de la Figure 47 montrent que d'une manière générale le traitement plasma oxygène diminue légèrement la contribution des énergies de surfaces dispersives (interactions de van der Waals), mais augmente fortement les contributions des interactions polaires (interactions hydrogène et électrostatiques). On remarque également que le dioxyde de silicium présente des interactions polaires légèrement plus importantes que le nitrure de silicium.

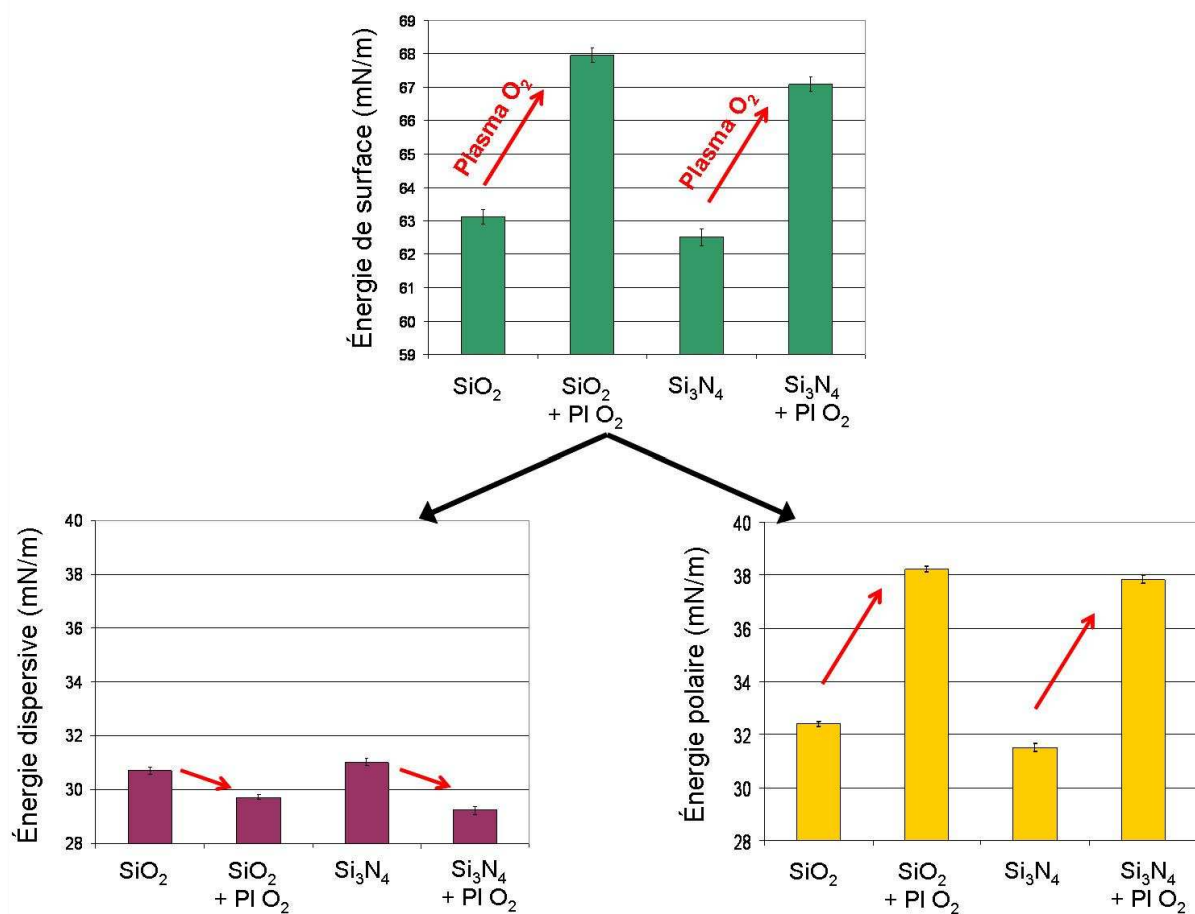


Figure 47 : comparaison de l'énergie de surface sur 4 types de surface : SiO_2 et Si_3N_4 avec ou sans traitement plasma oxygène. Le graphique du haut présente l'énergie de surface totale de chaque type de puce, les deux graphiques du bas comparent les contributions polaires (à droite) et dispersives (à gauche) des deux matériaux et leur évolution après un traitement plasma oxygène (flèches rouge). Les valeurs d'énergie de surface présentées sont calculées à partir des valeurs moyennes d'angles de goutte des différents liquides et leur écart type (sur 5 mesures au minimum) selon la méthode Owens & Wendt.

4. Valeurs de scellement

Notre puce en silicium est destinée à permettre des mesures de courants ioniques en configuration cellule entière. Dans cet objectif, nous avons retenu un seuil de valeur de résistance de scellement à partir duquel notre puce est dite fonctionnelle : 100 M Ω . En effet, à partir de cette valeur, le courant de fuite est suffisamment faible pour permettre l'enregistrement des courants ioniques en cellule entière. Toutefois, notre objectif à terme reste d'obtenir un maximum de résistances de scellement supérieures au GigaOhm pour obtenir des enregistrements de très haute qualité en termes de sensibilité et de stabilité.

4.1. Mise en œuvre de la mesure

Pour évaluer l'effet des différents paramètres de la puce en silicium sur les valeurs de résistance de scellement de cellule, j'ai testé les six types de puces décrits dans la Figure 38. Toutes les puces utilisées ont été nettoyées par trois Caro successifs et utilisées dans les 3 jours suivants. Les traitements plasma oxygène ont été réalisés sur les puces, dans un four plasma (Plasma System Femto de la société Diener) à 100W pendant 45 secondes. Tous les tests avec cellules ont eu lieu dans les deux heures qui suivent la préparation de la suspension d'une part (afin de s'assurer d'une qualité optimale) et le traitement plasma des puces d'autre part (avant que les effets bénéfiques, en particulier l'hydrophilie des surfaces, ne s'atténuent). Les valeurs de résistance de scellement ont été relevées une fois qu'une valeur stable était atteinte et que l'aspiration était relâchée. Pour chaque type de puce, au minimum 25 valeurs de résistance de scellement ont été mesurées. Tout au long de l'étude, nous n'avons utilisé qu'une seule et même lignée cellulaire CHO exprimant les canaux IRK1, préparée et conservée selon le protocole optimal défini dans la partie B.2 de ce chapitre. Cette précaution permet de s'affranchir de la variabilité qui existe entre les différentes lignées cellulaires.

4.2. Effet du plasma oxygène

La première constatation est l'effet très bénéfique du traitement plasma oxygène pour obtenir des scellements très résistifs [115] (poster en Annexe 8). La Figure 48 présente la distribution des valeurs de scellement pour la puce P3⁵ selon qu'elle ait subi un traitement plasma oxygène ou non. Sans traitement plasma préalable, aucune résistance de scellement n'est supérieure à 100 MΩ. Lorsque la puce subit un traitement plasma oxygène avant l'expérience, on remarque que le taux de scellements supérieurs à 100 MΩ est égal à 80% et que le taux de « gigaseals » atteint 50 %. L'effet positif du plasma oxygène n'est pas propre à la puce de type P3, mais se retrouve de manière identique sur tous les types de puces: quelle que soit la puce, le taux de résistance de scellements supérieurs à 100 MΩ est de 0% sans plasma oxygène et de plusieurs dizaines de % après traitement.

Ainsi dans la suite du manuscrit, seuls les résultats relatifs à des puces traitées au plasma oxygène avant l'expérience de patch-clamp seront présentés et discutés.

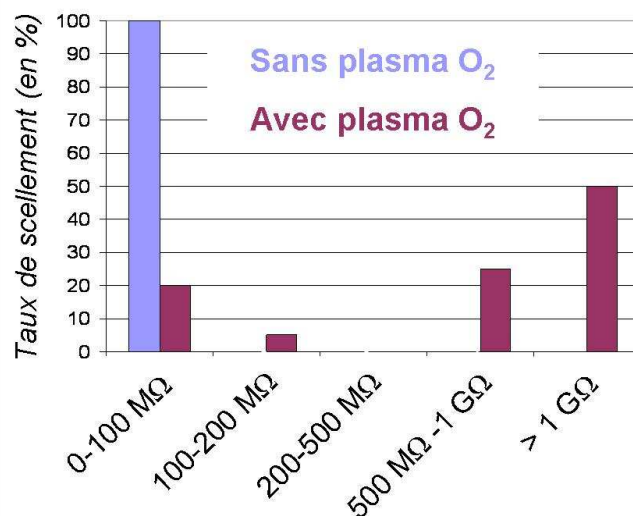


Figure 48 : Effet du traitement plasma oxygène sur la distribution des valeurs de résistances de scellement sur des puces de type P3 (caractéristiques : $\varnothing_{\text{pore}} = 1.8 \mu\text{m}$, $h = 8.5 \mu\text{m}$, surface : SiO₂, $R_{\text{rms}} = 49 \text{ \AA}$).

⁵ Puce P3 : $\varnothing_{\text{pore}} = 1.8 \mu\text{m}$, $h = 8.5 \mu\text{m}$, surface : SiO₂, $R_{\text{rms}} = 49 \text{ \AA}$

4.3. Effet du matériau en surface

Les propriétés de la surface sont très importantes pour la formation du scellement comme l'illustre la Figure 49. La comparaison des puces de type P1⁶ et P2⁷, qui ne diffèrent que par le matériau de la surface, permet de montrer que SiO₂ est plus favorable à la formation de scellements résistifs que Si₃N₄. En effet, sur le nitrure de silicium, seules 60% des résistances de scellement sont supérieures à 100 MΩ, contre 80 % sur le dioxyde de silicium.

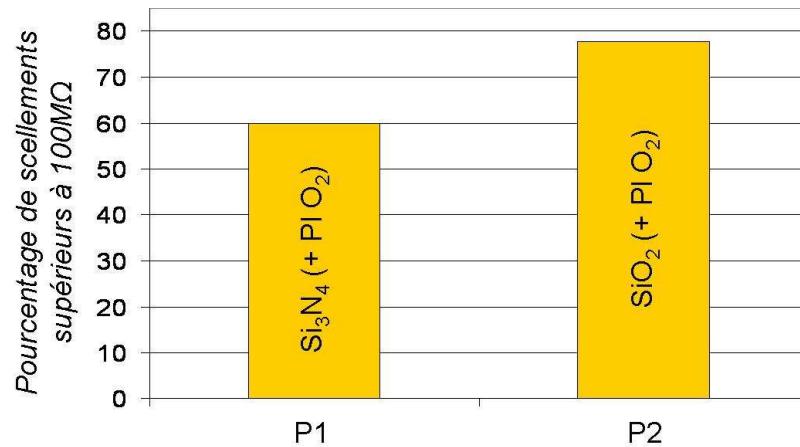


Figure 49 : Effet de la nature du matériau en surface sur la valeur de la résistance de scellement. Comparaison entre les puces de type P1 et P2 qui possèdent des caractéristiques identiques excepté le matériau en surface: SiO₂ et Si₃N₄ pour les puces P1 et P2 respectivement.

Cette tendance (non montrée) se retrouve également lorsque l'on compare les pourcentages de résistances de scellements entre les puces P5 et P6 qui, elles aussi, ne diffèrent que par le matériau en surface.

4.4. Effet du diamètre du microtrou

Sur la Figure 50, on constate que le diamètre du microtrou influe sur la formation du scellement entre la membrane cellulaire et microtrou. Diminuer le diamètre du microtrou de 2,5 (puces P5⁸) à 1,8 μm (puces P4⁹) permet d'augmenter le pourcentage de scellements supérieurs à 100 MΩ de 63 à 82%.

⁶ Puce P1 : Ø_{pore} = 1.8 μm, h = 2.12 μm, surface : Si₃N₄, R_{rms} = 6 Å

⁷ Puce P2 : Ø_{pore} = 1.8 μm, h = 2.22 μm, surface : SiO₂, R_{rms} = 6 Å

⁸ Puce P4 : Ø_{pore} = 1.8 μm, h = 8.62 μm, surface : SiO₂, R_{rms} = 50 Å

⁹ Puce P5 : Ø_{pore} = 2.5 μm, h = 8.62 μm, surface : SiO₂, R_{rms} = 50 Å

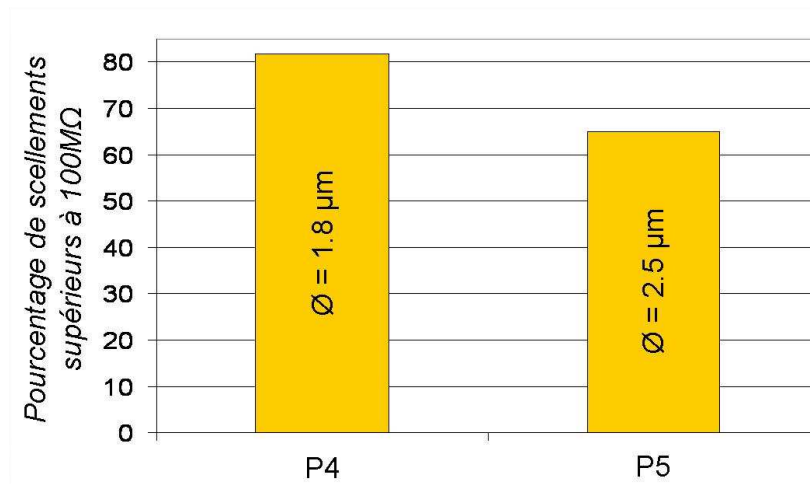


Figure 50 : Effet du diamètre du microtrou sur la valeur de la résistance de scellement. Comparaison entre les puces de type P4 et P5 qui possèdent des caractéristiques identiques excepté le diamètre du microtrou : 1,8 et 2,5 μm pour les puces P4 et P5 respectivement.

4.5. Effet de l'épaisseur de la membrane de diélectrique et de la rugosité

Lors de la présentation des différents types de puce, nous avons remarqué que la rugosité de la surface et que l'épaisseur de la membrane de diélectrique étaient corrélées. Nous avons également précisé que la détermination de l'influence de chacun de ces deux paramètres serait impossible ou approximative.

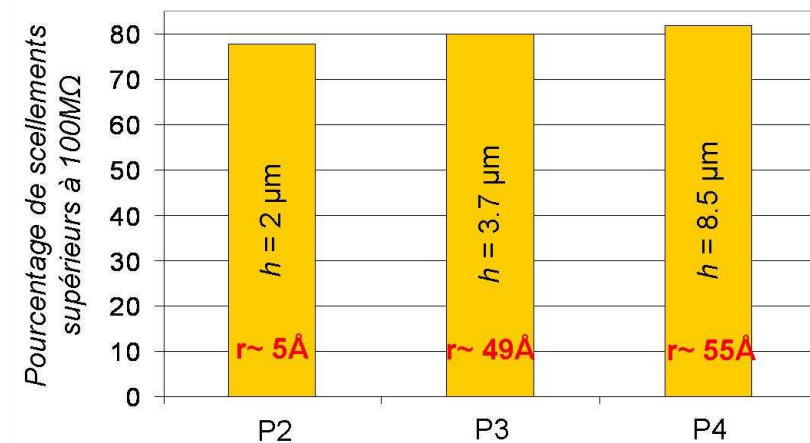


Figure 51 : Effets de l'épaisseur de la membrane de diélectrique et de la rugosité sur la valeur de la résistance de scellement. Comparaison entre les puces de type P2⁷, P3⁵ et P4⁸ qui possèdent des caractéristiques identiques excepté l'épaisseur h et la rugosité.

La Figure 51 présente une comparaison du pourcentage de résistances de scellement supérieures à 100 MΩ en fonction de l'épaisseur de la membrane de diélectrique et de la rugosité sur les puces de type P2, P3 et P4. Bien que ces deux paramètres ne soient pas décorrélés, nous constatons qu'ils n'ont pas une influence significative sur la formation du

scellement, dans les gammes de valeurs que nous avons choisi de tester. En effet la différence entre chaque type de puce n'est que de 2%, alors que pour les paramètres tels que le matériau ou le diamètre nous avons relevé des différences de 20%.

D. Discussion et conclusion

1. Bilan sur l'influence des paramètres de la puce

Pour favoriser la formation du scellement de la membrane cellulaire sur le microtrou, l'hydrophilie de la surface semble être le paramètre le plus important. En effet le traitement des surfaces des puces au plasma oxygène permet d'obtenir entre 60 et 80% de résistances de scellement supérieures à 100 M Ω suivant le type de puce. Dans la partie C.3 (caractérisation des puces), j'ai montré que le traitement plasma oxygène a pour principal effet de rendre la surface très hydrophile en augmentant les interactions polaires. Par ailleurs, cet effet positif se retrouve lors de la comparaison des surfaces de SiO₂ (puces P2) et Si₃N₄ (puces P1), où le pourcentage de résistances de scellement supérieures à 100 M Ω est de 78 et 60% respectivement. Rappelons que ces deux surfaces, après un traitement plasma oxygène, ne se différencient pratiquement pas par leur composition atomique en surface, mais par leurs énergies de surface (ce qui suppose que les deux types de surface, bien que semblables à de la silice, présentent des liaisons différentes en surface): le SiO₂ possède une énergie de surface légèrement plus importante (et en particulier les interactions polaires) que le Si₃N₄. Ainsi, ces deux observations nous conduisent à penser que les interactions polaires en surface favorisent la formation de scellements très résistifs. De plus, nous validons ici une des hypothèses énoncées par Corey et Stevens en 1984, selon laquelle les interactions hydrogènes et électrostatiques sont impliquées dans la formation des scellements cellule/substrat dans les expériences de patch-clamp [96].

Le diamètre du microtrou apparaît également dans cette étude comme un paramètre déterminant. En effet nous avons montré que la diminution du diamètre de 2,5 à 1,8 μ m favorise la formation du scellement et permet d'augmenter le pourcentage de scellements valides de 63 à 82%. Ces résultats rejoignent les observations de Pantoja *et al*, qui affirment que les valeurs optimales de diamètre de pore pour la formation de scellements de cellules de mammifères de 10 à 15 μ m de diamètre sont comprises entre 1 et 2 μ m [99]. Diminuer le diamètre du microtrou permet de réduire le volume du canal annulaire conducteur entre la membrane de la cellule et le substrat et donc de diminuer le courant de fuite. Cependant nous supposons qu'il existe un diamètre limite en dessous duquel les propriétés élastiques de la membrane de la cellule ne lui permettent plus de s'invaginer correctement dans le pore.

Bien qu'elles soient restées corrélées dans notre étude, la rugosité de la surface et l'épaisseur de la membrane de diélectrique semblent être des paramètres secondaires pour la formation du scellement (dans la gamme de valeur que nous avons fixée). La logique et les travaux précédents laissent supposer qu'un microtrou avec une hauteur importante (c'est-à-dire une épaisseur de membrane diélectrique importante) est favorable à la formation du scellement puisqu'une plus grande surface d'adhésion est offerte à la membrane cellulaire qui s'invagine. Toutefois, dans le cas du patch-clamp planaire, un microtrou avec une profondeur trop importante, c'est-à-dire avec un facteur d'aspect trop grand, oblige à pratiquer une aspiration plus forte, et donc moins contrôlable, pour attirer la cellule sur le microtrou. Pratiquer une

aspiration forte pour attirer la cellule revient à augmenter la probabilité d'endommager la cellule lorsqu'elle rentre en contact avec le pore. Nous supposons qu'il existe un compromis entre une épaisseur de membrane diélectrique assez importante pour offrir un maximum de surface de contact à la membrane cellulaire et assez faible pour attirer la cellule sur le pore avec une aspiration très faible et avec peu de risque d'endommager la cellule.

La rugosité est certainement le paramètre dont il est fait le moins référence dans la littérature et pour lequel aucune caractérisation n'est connue. Dans notre étude, nous constatons cependant qu'une rugosité de l'ordre de 50 Å n'empêche en rien la formation de scellements résistifs et de « gigaseals ». Malgré ceci, notre intuition nous laisse supposer que des rugosités plus faibles (de l'ordre de 5 Å) sont plus bénéfiques pour la formation du scellement.

Pour conclure sur ce bilan, il est important de noter que nous n'avons pris en compte que les paramètres relatifs à la puce en silicium. Il serait cependant très intéressant d'étudier l'influence d'autres paramètres:

- la composition ionique des tampons électrophysiologiques utilisés, en particulier la concentration des ions divalents. En effet, nous avons vu dans le paragraphe A.2.3.3 de ce chapitre que les divalents sont très probablement impliqués dans les mécanismes de formation du « gigaseal ».
- la préparation de la suspension cellulaire et le temps de résidence des cellules dans le tampon électrophysiologique avant la mesure.

De même, une étude précise de la durée de vie du « gigaseal » pourrait être menée ultérieurement afin d'apporter des informations sur la stabilité du scellement.

2. Exploitation des résultats par le plan d'expériences

2.1. Préparation de l'analyse

L'idée première de cette étude était, rappelons-le, de suivre un plan d'expériences, en définissant une matrice d'expériences afin de réduire le nombre de tests à réaliser pour quantifier l'influence de chaque paramètre de la puce sur la formation du scellement. Les aléas de la fabrication des puces m'ont amené à reconsidérer cette matrice et à bâtir une matrice simplifiée. A l'aide du Laboratoire de Simulation et Caractérisation des Dispositifs et Procédés¹⁰, j'ai pu exploiter les mesures de résistances de scellement collectées pour chaque type de puce. L'exploitation des résultats se fait grâce à des logiciels spécialisés, comme Modde, Corico, NemrodW...

Nous avons tout d'abord regroupé toutes les valeurs de résistances de scellement et constaté qu'elles suivaient une loi log normale, c'est-à-dire que le logarithme (base 10) des valeurs de résistances (en MΩ) suit une loi statistique normale. La Figure 52 présente la courbe du logarithme des résistances de scellement en fonction des valeurs d'une loi normale centrée et réduite. On obtient ainsi une droite avec un coefficient de corrélation de 0.989, relativement bon pour des valeurs issues d'expériences avec le vivant. On remarque toutefois « un enroulement » des points autour de la droite, ce qui traduit le fait que les valeurs ne suivent pas parfaitement cette loi statistique.

¹⁰ Contact : François De Crecy.

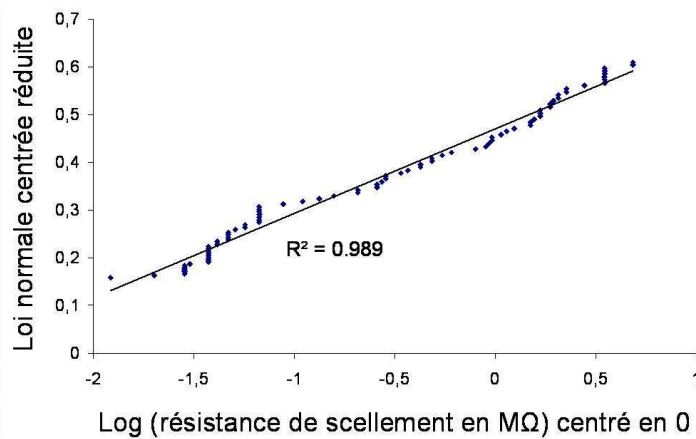


Figure 52 : détermination de la répartition statistique des valeurs de résistances de scellement. Valeurs d'une loi normale centrée réduite tracées en fonction du logarithme des résistances de scellement (en MΩ) centré en 0 (points bleu). La droite de régression linéaire (en noir) donne un coefficient de corrélation R^2 de 0.989

Pour chaque type de puce, j'ai ainsi calculé la valeur moyenne et l'écart type du logarithme des résistances de scellement. De plus afin de déterminer l'erreur sur la moyenne et l'écart type, j'ai suivi la méthode de « bootstrapping » qui consiste à réaliser plusieurs tirages aléatoires de m valeurs parmi n valeurs ($m < n$) et à déterminer pour chaque liste générée la valeur moyenne et l'écart type. On calcule ensuite la moyenne et l'écart type des moyennes et des écarts types ainsi calculés. On détermine ici une erreur globale qui permet de tenir compte des incertitudes qu'il existe sur tous les paramètres de la puce, mais aussi sur la variabilité cellulaire.

2.2 Analyse des résultats

Le logiciel d'exploitation permet de résoudre le système d'équation composé de la valeur moyenne de la résistance de scellement pour chaque type de puce (12 au total : 6 types de puces différents, traités ou non au plasma oxygène) et des différents paramètres pondérés par les coefficients à déterminer.

Avec un plan d'expériences optimal, la réponse attendue est de la forme :

$$\begin{aligned} (\text{pourcentage de scellement supérieurs à } 100 \text{ M}\Omega) = & a_1 \times (\text{diamètre du microtrou}) \\ & + a_2 \times (\text{épaisseur de membrane}) \\ & + a_3 \times (\text{rugosité}) \\ & + a_4 \times (\text{énergie de surface}). \end{aligned}$$

Dans notre cas, il n'a pas été possible de pondérer l'influence des différents paramètres sur la formation du scellement, c'est-à-dire de calculer des coefficients a_i fiables. Toutefois l'analyse a fait ressortir deux paramètres significatifs, l'énergie de la surface et le diamètre du trou. Le signe des coefficients calculés montre également qu'il faut augmenter l'énergie de surface et diminuer le diamètre du microtrou pour accroître le pourcentage de scellements supérieurs à 100 MΩ.

La rugosité et l'épaisseur de membrane de diélectrique apparaissent comme des paramètres secondaires mais aucune information supplémentaire ne se dégage de l'analyse.

2.3. Conclusion

Dans cette étude, la forte corrélation entre rugosité et épaisseur de membrane diélectrique nous empêche de déterminer de manière précise les coefficients qui pondèrent les différents paramètres d'une puce de patch-clamp. Cependant cette approche a montré qu'elle peut faire ressortir des paramètres significatifs et des tendances confirmées par l'analyse classique des résultats. L'analyse par plan d'expériences a montré tout son potentiel dans le cadre de cette étude : la conception et la fabrication de nouveaux types de puces, qui permettraient notamment de décorrélérer la rugosité et l'épaisseur de membrane, devrait permettre de confirmer ces résultats et pondérer chaque paramètre de manière précise.

3. Conclusion et design de la puce « optimale »

Avant de conclure sur cette étude, je tiens à préciser l'importance de la préparation de la suspension cellulaire, qui hors des paramètres relatifs à la puce, constitue la clé de la réussite de l'expérience de patch-clamp planaire.

L'étude que j'ai menée pour l'optimisation de l'interaction entre la membrane cellulaire et le microtrou de la puce en silicium a tout d'abord permis de concevoir des puces offrant des rendements de scellements résistifs importants, équivalents à ceux obtenus avec la micropipette de verre dans la technique de patch-clamp conventionnelle et équivalent (Sophion Biosciences, [58]) ou même supérieurs (Molecular Devices, [116]) à ceux obtenus sur les surfaces SiO_2 de puces patch-clamp actuellement commercialisées. En effet, le meilleur type de puce conçu pour cette étude offre 82 % de scellements supérieurs à 100 M Ω et donc exploitables pour des mesures en cellule entière, et plus de 55% de gigaseals. Les scellements obtenus sont très stables et permettent de passer dans plus de 65 % des cas à des configurations en cellule entière stables pendant plus de 20 minutes. Ces résultats très prometteurs constituent en eux-mêmes un bilan très positif.

Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre, l'intérêt des puces patch-clamp en silicium réside dans leur potentiel à implémenter des fonctions actives comme des électrodes de positionnement, de mesures, l'intégration de l'électronique... L'ajout de telles fonctions impose souvent des contraintes techniques et des incompatibilités apparaissent entre les différents procédés de fabrication. Il est alors nécessaire de faire des compromis et de connaître quelles sont les caractéristiques indispensables de tels ou tels éléments. L'étude que j'ai réalisée s'inscrit dans ce cadre, et souligne l'importance primordiale de deux paramètres parmi quatre, l'énergie de surface et le diamètre du microtrou, des concessions pouvant être réalisées sur la rugosité et l'épaisseur de la membrane diélectrique par exemple.

J'aimerais insister également sur les informations fondamentales que de telles études peuvent apporter. Nous le savons désormais, le mécanisme de scellement est très mal connu et peu d'études en font l'objet. A mon sens, une des principales raisons pour le manque de travaux dans ce domaine reste le support de l'étude : la micropipette de verre. En effet, au début de mes travaux de thèse, j'avais souhaité caractériser de diverses manières la pointe des micropipettes de verre, mais je me suis heurté à l'incompatibilité de la forme, de la taille et de la nature de la pipette avec les diverses méthodes de caractérisation de surface (XPS, sonde ionique, détection X, mesures d'énergie de surface...). L'utilisation de substrat planaire offre de nombreuses possibilités de caractérisations qui devraient aider à la compréhension de l'interaction entre la membrane et le substrat. D'un point de vue fondamental, les caractérisations d'énergie de surface m'ont permis de mettre en évidence l'importance des

interactions polaires dans le mécanisme de formation de scellement. Depuis les hypothèses énoncées en 1984 par Corey et Stevens, aucune étude n'avait montré l'implication d'une des interactions citées pour la formation du scellement et les substrats planaires apparaissent comme des outils permettant de combler ce manque.

Par la diversité des caractérisations effectuées, ce travail apporte de nombreuses informations sur l'interaction de la membrane avec le substrat. Nous avons discriminé deux paramètres déterminants pour la formation du scellement, l'énergie de surface et le diamètre du trou, qu'il faut tenter d'augmenter et de diminuer respectivement pour améliorer le rendement des mesures de patch-clamp. Ces résultats préliminaires sont très encourageants et vont dans le sens de pouvoir prédire pour un type de puce donné le taux de réussite de scellements exploitables, en fonction de la valeur des paramètres de la puce. Dans cet objectif, nous avons donc lancé la fabrication d'une puce que nous espérons « optimale » (Figure 53). Au vu des résultats de l'étude, elle présente une surface en SiO_2 PECVD et un microtrou d'un diamètre égal voire inférieur à $1.8 \mu\text{m}$. Par ailleurs, nous avons décidé de favoriser une surface de très faible rugosité (inférieure à 10 \AA) et de réaliser une membrane diélectrique de 4 ou $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur (pour un bon compromis entre longueur d'invagination de la membrane et faible aspiration nécessaire pour positionner la cellule).

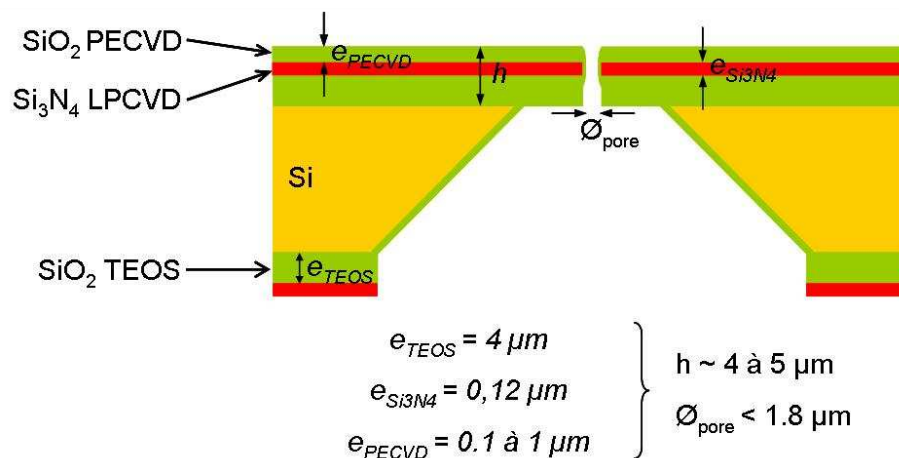


Figure 53 : puce « optimale » conçue à partir des résultats de l'étude de l'interaction cellule/microtrou. En cours de fabrication.

Chapitre 4 : Optimisation de la capacité de la puce et validations électrophysiologiques

A. Sensibilité du système et réduction de la capacité de la puce

1. Présentation du problème

Dans le chapitre 1 nous avons présenté les verrous technologiques inhérents à la technique du patch-clamp planaire et en particulier à l'utilisation de substrats en silicium. Dans cette partie je souhaite détailler le problème de la capacité intrinsèque des substrats en silicium. En effet, à cause de leur structure et des propriétés électriques des matériaux utilisés (détails dans la partie A.3 de ce chapitre), ces puces présentent des capacités généralement élevées comparées aux puces en verre, en PDMS ou en plastique constituées uniquement de matériaux isolants. A titre d'exemple, Willumsen *et al* annoncent une capacité pour leur puce en silicium de 50 pF [69], alors qu'avec une puce en borosilicate, Brueggemann *et al* proposent une puce patch-clamp avec moins de 1 pF de capacité [86]. Cette dernière valeur est inférieure aux capacités mesurées sur la plupart des micropipettes de verre.

Il est important de parvenir à diminuer les capacités des puces en silicium, car elles sont sources de quatre principales contraintes pour l'enregistrement des courants ioniques :

- les capacités formées par les différents éléments du système influent sur le temps de réponse de la chaîne de mesure [35, 54]. Ainsi, afin d'enregistrer la réponse de canaux ioniques unitaires (dont les durées d'ouverture sont de quelques millisecondes), il est nécessaire de diminuer au maximum les capacités et augmenter, de ce fait, la fréquence de réponse du système. Toutefois, nous n'aborderons pas ce point dans la suite, car la mesure de l'activité de canaux ioniques unitaires n'est pas traitée dans ce manuscrit.
- dans une chaîne de mesure électronique, les éléments capacitifs en amont de la chaîne constituent des antennes sensibles aux perturbations électriques de l'environnement. Ainsi, plus la capacité de la puce patch-clamp est élevée, plus le système de mesure est parasité par les signaux extérieurs.
- les capacités sont sources d'un bruit électronique, dit bruit diélectrique, qui est amplifié. Ce bruit dépend entre autres des caractéristiques de l'électronique de mesure, mais peut être minimisé en diminuant la capacité de la puce en silicium, dans notre cas.
- enfin, une capacité trop élevée du substrat peut masquer le passage en configuration cellule entière qui se caractérise par l'apparition de pics capacitifs sur le signal (cf chapitre 1) relatifs à la capacité de la membrane cellulaire. Pour des cellules de mammifères de 10 à 15 μm de diamètre, la capacité membranaire totale est de l'ordre de 10 pF et doit être mesurée précisément pour certaines applications où la normalisation des courants ioniques est souhaitée. Pour réaliser cette mesure, il est donc nécessaire de posséder un substrat dont la capacité est, dans le cas idéal, inférieure à celle de la membrane cellulaire ou tout du moins comparable [117]. Dans notre cas, l'amplificateur MultiClamp 700A possède un circuit de compensation de la capacité du substrat au maximum de 36 pF, et un circuit de compensation spécifique pour déterminer la capacité de la membrane cellulaire. Notre objectif est donc dans un premier temps de concevoir une puce dont la capacité est compensable par le circuit électronique, puis si possible de s'approcher de la valeur de la capacité membranaire de la cellule.

2. Les sources de bruit en électrophysiologie

En électronique ou en électricité, le signal est la composante d'un enregistrement dont on veut déterminer les propriétés (ici le courant issu des canaux ioniques). Le bruit est la composante

qui se superpose au signal lors de son enregistrement, et on parle fréquemment du rapport signal sur bruit pour comparer ces deux composantes [35]. En général, le bruit génère des variations aléatoires du signal sur l'enregistrement (de courant en A ou de tension en V). Sur l'écran c'est l'amplitude « crête à crête » de ce bruit qui est visible. Pour définir un bruit, on parle habituellement de sa valeur efficace, ou rms, mais il est également caractérisé par son amplitude et sa fréquence. De nombreux bruits possèdent une distribution gaussienne et dans ce cas, les valeurs « crête à crête » (I_{max}) et rms (I_{rms}) vérifient, pour un courant par exemple :

$$I_{rms} = \frac{I_{max}}{\sqrt{2}} \quad \text{Équation 16}$$

La mesure la mieux appropriée de l'amplitude d'un bruit est sa valeur rms ou la racine carrée de sa variance s^2 (s, déviation standard), déterminée à partir de la distribution. La relation liant l'intensité et la fréquence du bruit peut prendre soit la forme de l'amplitude du bruit (en A_{rms}^2) en fonction de la fréquence, soit la forme de la densité spectrale de puissance (Power Spectral Density, PSD) exprimée en A_{rms}^2 divisée par la fréquence en Hz.

Enfin, il est important de connaître la bande de fréquence, B (« Bandwidth »), dans laquelle le bruit est observé. Quelques bruits sont naturellement restreints sur une bande de fréquence, mais la plupart requièrent l'utilisation d'un filtrage pour réduire la bande de fréquence et permettre une bonne résolution du signal (c'est-à-dire augmenter le rapport signal sur bruit) [54].

2.1. Sources de bruits externes

Les sources de bruits externes sont nombreuses et très diverses. Il est possible de les regrouper en deux types de sources : le courant alternatif de fréquence 50 Hz qui alimente l'installation et les appareils environnants, et les radiations électriques (souvent de fréquences plus élevées) créées par des appareils comme les tubes fluorescents, les moteurs rotatifs, les réfrigérateurs, les moniteurs d'ordinateurs, etc [35]. Ces radiations sont captées par l'étage de pré-amplification et par tous les éléments qui forment des antennes de réception, comme dans notre cas la puce silicium et la totalité du système d'assemblage (avec les capillaires remplis de solution saline conductrice en particulier).

La protection du système de mesure contre ces bruits externes est assurée par une cage de Faraday. Pour les expériences de patch-clamp, il s'agit en général d'une enceinte en grillage à maillage fin reliée à la terre de l'amplificateur. La cage protège l'ensemble des systèmes qu'elle environne, des radiations électriques extérieures. Dans la mesure du possible, les boîtiers d'alimentation électrique sont placés à l'extérieur de la cage. Les parties conductrices à l'intérieur de la cage doivent être reliées à la terre en évitant les boucles de masse, et la tête d'amplification est mise à la terre (la même) de l'amplificateur par le cordon de raccordement.

Notre système est placé dans une cage de Faraday commerciale conçue pour les expériences de patch-clamp conventionnel. Si cette cage est très efficace lors de l'utilisation d'une pipette de patch-clamp, sa protection contre les perturbations extérieures, en particulier le 50 Hz, s'avère insuffisante lors de l'utilisation de notre système planaire. Il constitue en effet une capacité de couplage avec l'environnement plus importante qu'une simple pipette de verre et forme une antenne plus sensible aux radiations. Afin de s'affranchir des signaux parasites de 50 Hz nous utilisons un appareil soustracteur de 50 Hz, le HumBug®, placé entre la sortie de l'amplificateur et la carte d'acquisition.

2.2. Sources de bruits internes

2.2.1. Les différents bruits

Les bruits d'origine interne sont liés aux fluctuations spontanées qui affectent les sources de tension et de courant dans les divers composants d'un circuit. Ces fluctuations sont dues à l'existence de mouvements désordonnés des charges élémentaires qui sont en général animées d'un mouvement aléatoire. Ainsi la tension ou le courant considérés fluctuent de manière aléatoire autour de leur valeur moyenne. Ce bruit électrique peut être divisé en quatre principales composantes détaillées ci-dessous [54, 56, 118].

Le bruit thermique (thermal noise) résulte du mouvement brownien, aléatoire, de toute particule chargée excitée thermiquement dans un conducteur. Il est créé par toute résistance et porte le nom de « bruit de Johnson ». Il se produit en l'absence de courant appliqué et donne naissance à une tension ou un courant bruités. La densité spectrale de puissance, PSD, est dite « blanche » c'est-à-dire qu'elle ne dépend pas de la fréquence, mais est dépendante de la température. Sa valeur, S_{thl}^2 , donnée comme la PSD d'un bruit associé au courant vaut :

$$S_{thl}^2 = \frac{4kT}{R} \text{ (en A}^2\text{/Hz)} \quad \text{Équation 17}$$

où k est la constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} J/°K), T la température absolue en Kelvin, et R la résistance en Ohms. Le bruit rms associé à un courant sur une largeur de bande de fréquence B vaut donc :

$$I_{thl} = \sqrt{\frac{4kTB}{R}} \quad \text{Équation 18}$$

Le bruit de grenaille (shot noise) a pour origine le mouvement discontinu de porteurs de charges dans un milieu conducteur. Ce bruit est lié à tout courant circulant à travers une barrière de potentiel, comme dans les jonctions p-n dans les composants semi-conducteurs. Les barrières de potentiel n'étant pas présentes dans les résistances, le bruit de grenaille n'y existe pas. Sur une largeur de bande B , la valeur rms du bruit de grenaille du courant est donnée par :

$$I_{sh} = \sqrt{2qIB} \quad \text{Équation 19}$$

où q est la charge élémentaire du transporteur de charge (1.6×10^{-19} C pour l'électron), et I le courant (DC) en Ampère.

Dans les amplificateurs opérationnels, le bruit de grenaille associé au courant d'entrée vient du courant de biais en entrée I_b . En général, le courant de biais dans les amplificateurs varie entre 0.1 pA et 1 µA, ce qui, pour une largeur de bande de 10 kHz, représente des bruits de grenaille de 0.018 à 57 pA rms respectivement.

Le bruit diélectrique (dielectric noise) apparaît dans les diélectriques imparfaits. Dans un diélectrique parfait, isolant idéal, les charges se maintiennent séparées lorsqu'il est porté à un potentiel déterminé. Dans la majorité des cas, un diélectrique est imparfait : il présente des propriétés de perte de charges ou dissipation, corrélées à des déplacements de charges dans la matière. La PSD de ce bruit S_D^2 est décrite en fonction du facteur de dissipation D et de la capacité C_D du diélectrique et de la fréquence f :

$$S_D^2 = 4kTDC_D(2\pi f) \quad \text{Équation 20}$$

Pour une largeur de bande B , le bruit diélectrique rms associé au courant I_D , vaut alors :

$$I_D = \sqrt{4kTDC_D B^2} \quad \text{Équation 21}$$

Les diélectriques « les plus parfaits » (comme le quartz, SiO_2 , certaines céramiques...) possèdent des facteurs de dissipation compris entre 10^{-4} et 10^{-5} . Pour les verres comme le borosilicate D est au minimum de 0.01.

Le bruit de scintillation (excess noise) qualifie tout bruit présent dans un élément d'un circuit, en plus des trois précédents. Par exemple, les résistances présentent un bruit faible fréquence dont la PSD est inversement proportionnelle à la fréquence. Ce bruit, souvent appelé « bruit $1/f$ » se superpose au bruit thermique. Les composants semi-conducteurs présentent également ce type de bruit.

2.2.2. Localisation de ces bruits

Membrane cellulaire et scellement

Dans le chapitre 1, nous avons détaillé le schéma électrique équivalent d'une cellule et montré que sa membrane s'apparente à un circuit RC, dans lequel R est la résistance du fragment de membrane étudié et C sa capacité. Cette capacité (qui, rappelons-le, a pour origine les transferts de charges liés au fonctionnement de diverses protéines autres que les canaux ioniques et les diverses molécules polaires intégrées dans la membrane) génère un bruit de fond dominé par un bruit de grenaille. Il n'est donc pas possible de modifier et de diminuer ce bruit car il dépend du support biologique à étudier [35].

Le scellement, caractérisé par la valeur de sa résistance, est à l'origine d'un bruit thermique de Johnson. Ce bruit, qui est la composante dominante du bruit total, diminue lorsque la résistance de scellement augmente. Il est donc impératif de réaliser des scellements très résistifs pour diminuer le bruit et augmenter le rapport signal sur bruit.

Amplificateur

Le bruit intrinsèque d'un amplificateur opérationnel peut être décrit par un bruit associé à une tension E_n en série avec l'entrée négative et un bruit associé à un courant I_n entre les entrées positive et négative. En patch-clamp, l'amplificateur est monté en convertisseur courant-tension, avec la résistance de rétroaction R_f et une capacité globale C_g représentant les capacités en amont de l'entrée de l'amplificateur [54].

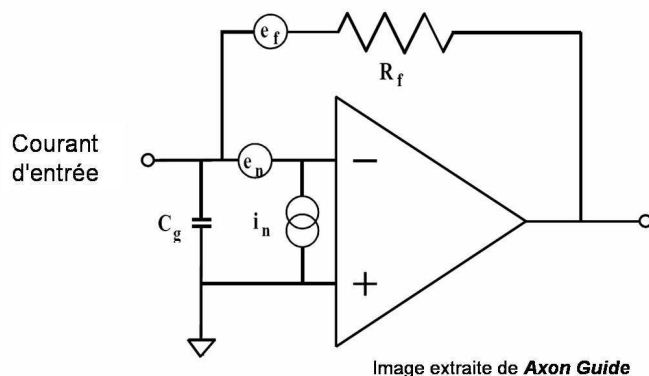


Figure 54 : modèle du bruit dans un convertisseur courant-tension utilisé dans l'étage de pré-amplification en patch-clamp.

Dans le circuit de la Figure 54, e_n et i_n sont les PSD relatives aux bruits associés à la tension E_n et au courant I_n respectivement, e_f est la PSD du bruit thermique et de scintillation de la résistance de rétroaction R_f . En considérant tous les bruits présents, on obtient la valeur du bruit rms en courant pour une largeur de bande B :

$$I_{in} = \sqrt{i_n^2 B + \frac{e_f^2}{R_f^2} B + e_n^2 \left(\frac{B}{R_f^2} + \frac{4}{3} \pi^2 C_g^2 B^3 \right)} \quad \text{Équation 22}$$

On peut noter que si e_f est uniquement le bruit thermique de la résistance (et qu'on néglige le bruit de scintillation), e_f^2/R_f^2 vaut simplement $4kT/R_f$ (voir Equation 17).

Un ordre de grandeur de chaque composante de bruit peut être donné pour les amplificateurs de patch-clamp communs [54]. Dans le cas du gain d'amplification le plus important, c'est-à-dire avec R_f égale à 50 GΩ, le bruit thermique rms associé à cette résistance pour une largeur de bande de 10 kHz vaut 0.057 pA rms. Le bruit de grenaille est de l'ordre de 0.025 pA pour une largeur de bande de 10 kHz. Enfin, dans les amplificateurs de très haute qualité, e_n vaut environ 2-3 nV.Hz^{-1/2} et en patch-clamp conventionnel, la capacité globale C_g en entrée de l'amplificateur est comprise entre 15 et 20 pF. Ces valeurs permettent de calculer la contribution du terme $(4/3 \pi^2 e_n^2 C_g^2 B^3)$, de l'ordre de 0.15 pA pour une largeur de bande de 10 kHz. Ces contributions s'additionnent ensuite selon l'équation 22, donnant une valeur de I_{in} de 0.162 pA.

On constate alors que le bruit dominant dans un tel système dépend de C_g et de e_n [118]. Mis à part la contribution de bruit apportée par la capacité globale, toutes les autres contributions sont dépendantes des caractéristiques de l'appareil de mesure et ne peuvent être modifiées. La capacité globale regroupe toutes les capacités en entrée de l'amplificateur : la capacité du système de mesure, dont la puce en silicium, de la connexion entre l'amplificateur et le système de mesure, les capacités des circuits de compensation dans l'amplificateur.

Capacité du système et de la puce en silicium

Le bruit associé au système de patch-clamp planaire est important (plusieurs pA, cf partie A.6.1 de ce chapitre) et représente, outre la contribution liée à la cellule dans une configuration whole-cell, la source dominante de bruit. Les capacités de la puce en silicium, de l'assemblage et de la connexion à l'amplificateur contribuent à former une capacité globale en entrée de l'amplificateur qui réagit avec le bruit de la tension d'entrée, e_n , de la tête de pré-amplification et produit un bruit sur le courant mesuré (selon l'équation 22).

Les capacités formées par les connexions électriques entre l'amplificateur et le système d'assemblage sont fixées et sont dépendantes de la structure du prototype développé pour mon étude. Dans la suite de ce projet, le prototype d'assemblage doit évoluer vers un système plus industrialisable dont les caractéristiques électriques seront différentes. De ce fait, dans la phase actuelle de développement d'un démonstrateur de laboratoire, notre priorité est de contrôler et de proposer des solutions afin de réduire la capacité formée par la puce en silicium. Les bruits supplémentaires identifiés seront pris en considération dans la phase finale de développement d'un système automatisé.

3. Capacité de la puce en silicium

3.1. Notion de capacité pour un substrat planaire

Un condensateur est constitué fondamentalement de deux conducteurs électriques, ou armatures, très proches l'un de l'autre, mais séparés par un isolant ou diélectrique.

La charge électrique emmagasinée dans le condensateur est proportionnelle à la tension appliquée entre ses 2 armatures. Aussi, un tel composant est-il principalement caractérisé par sa capacité, rapport entre sa charge et la tension. Par abus de langage on utilise fréquemment le terme capacité pour désigner également le composant.

La capacité électrique d'un condensateur se détermine essentiellement en fonction de la géométrie des armatures et de la nature du ou des isolants ; la formule simplifiée suivante est souvent utilisée pour estimer sa valeur :

$$C = \varepsilon \frac{A}{d} \quad \text{Équation 23}$$

où ε est la permittivité du diélectrique, A la surface des armatures en regard et d la distance entre les armatures.

Les puces utilisées en patch-clamp planaire sont constituées en partie (cas des puces en silicium) ou en totalité (exemple des puces en verre) d'un matériau isolant pour les ions. Au niveau de chaque site de mesure, les solutions électrophysiologiques conductrices sont présentes de part et d'autre de la puce isolante, jouant ainsi un rôle équivalent aux armatures conductrices d'un condensateur. Il est donc possible de prévoir la capacité d'une puce de patch-clamp planaire en utilisant l'équation 23 et en considérant la permittivité diélectrique de la couche isolante utilisée, l'épaisseur de la ou des couches de matériau isolant et la surface de solution conductrice en contact avec la couche de diélectrique considérée que j'appellerai « surface mouillée » par souci de simplification.

3.2. Modèle électrique équivalent de la puce

3.2.1. Modèle détaillé

Notre puce en silicium est composée d'une épaisseur de 450 μm de silicium recouverte sur les deux faces par un empilement de couches diélectriques dont l'épaisseur totale est de quelques μm (Figure 55). Chaque couche de diélectrique est caractérisée par une capacité associée aux autres en série ou en parallèle, l'ensemble formant une capacité globale mesurable [119]. Dans ce paragraphe, chaque couche de matériau diélectrique est considérée de manière indépendante et la valeur de sa capacité est évaluée. Cette phase d'identification permettra dans la partie suivante de déterminer quelles sont les couches isolantes qui influent de manière significative sur la valeur globale de la capacité de la puce.

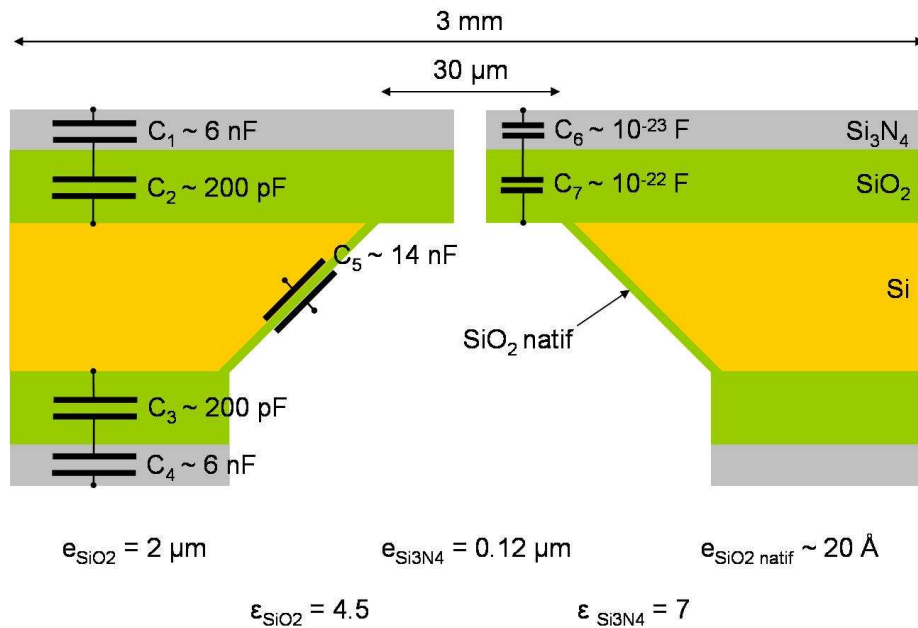


Figure 55 : schéma représentant la structure d'une puce silicium conçue pour l'étude de l'interaction membrane/microtrou (ici, puce P1, cf Chapitre 3) et les capacités formées par les différentes couches de matériau diélectrique. Ces couches sont caractérisées par leur épaisseur e et leur permittivité diélectrique ϵ . Un ordre de grandeur de ces capacités est donné en considérant l'utilisation d'un joint torique de diamètre interne 3 mm qui définit la surface de solution en contact avec la puce (« surface mouillée »). La cohérence entre échelles verticale et horizontale n'est pas respectée.

La Figure 55, qui représente la structure d'une puce conçue pour l'étude de l'interaction cellule/microtrou (puce P1, cf chapitre 3), détaille l'ensemble des capacités identifiables formées par les couches de matériau isolant. La capacité globale de la puce est formée par l'ensemble des 7 capacités recensées qu'il est possible de calculer selon l'équation 23 :

- les capacités C_1 et C_4 des couches supérieures et inférieures de Si_3N_4 sont évaluées en considérant la « surface mouillée » définie par un joint torique de 3 mm de diamètre interne. On obtient alors une capacité de l'ordre de 6 nF.
- les capacités C_2 et C_3 des couches supérieures et inférieures de SiO_2 sont évaluées de la même manière que les précédentes et sont de l'ordre de 200 pF.
- sur la face supérieure de la puce, nous avons considéré indépendamment les capacités C_6 et C_7 formées au niveau la membrane de diélectrique. Le calcul réalisé en considérant la surface formée par la membrane (soit $30 \times 30 \text{ µm}^2$) donne des capacités de l'ordre de 10^{-23} et 10^{-21} pour C_6 et C_7 respectivement.
- enfin il faut prendre en compte la capacité C_5 formée par la couche d'oxyde natif sur les faces de la gravure humide. Cet oxyde a une épaisseur nettement inférieure aux autres couches de diélectrique, de l'ordre de 10 à 20 Å, et forme donc la capacité la plus importante (environ 14 nF).

3.2.2. Modèle simplifié

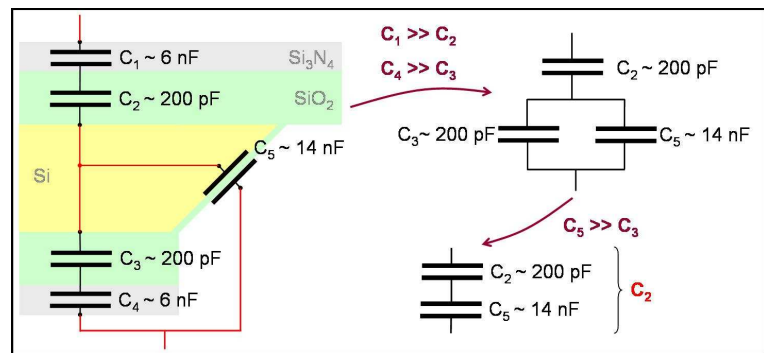
Il n'est pas possible de mesurer la contribution de chacune des capacités détaillées dans la Figure 55, mais seulement de caractériser la capacité globale de la puce. Cependant, en se basant sur les valeurs théoriques de chacune des capacités, il est possible de connaître leur

contribution et leur influence sur la capacité totale de la puce. Ma démarche de simplification repose donc sur les points suivants:

- C_6 et C_7 , disposées en parallèle des autres capacités, possèdent des valeurs très faibles et peuvent donc être négligées.
- Considérons le silicium comme un matériau parfaitement conducteur et négligeons la résistance qui existe entre les capacités C_2 , C_3 et C_5 . Ces trois capacités possèdent donc un nœud électrique commun (Figure 56).
- La forte différence d'épaisseur entre les couches de SiO_2 et de Si_3N_4 (2 à 7 μm suivant le type de puce contre 0.12 μm) permet de considérer que les capacités en série C_1 et C_2 ainsi que C_3 et C_4 se simplifient en une capacité C_2 et C_3 (Figure 56).
- Enfin, la capacité C_5 est grande devant la capacité C_3 avec laquelle elle est en parallèle. On considère alors que C_5 court-circuite C_3 .

Ce raisonnement a abouti à la Figure 56 qui montre que la capacité totale de la puce est en première approximation égale à la capacité C_2 de la couche supérieure de SiO_2 (Figure 56). Notons que cette approximation n'est valable que si la capacité C_5 de la couche d'isolant sur les faces de la gravure humide reste grande devant C_3 et C_4 .

Figure 56 : simplification de la capacité équivalente de la puce en silicium. Les différences d'ordre de grandeur des capacités permettent de faire des approximations. Au final, si C_5 est grande devant C_3 et C_2 , la capacité totale de la puce correspond environ à C_2 .



Compte tenu de l'analyse du schéma électrique équivalent de la puce en silicium et de l'Equation 23, trois solutions peuvent être proposées pour diminuer la capacité globale de la puce silicium:

- augmenter l'épaisseur des couches d'isolant. L'étape de simplification du schéma électrique équivalent montre que tant que la capacité C_5 prévaut sur la capacité des couches inférieures, la capacité globale de la puce est contrôlée par C_2 . Afin que la diminution de la capacité de la puce soit efficace, il est donc surtout nécessaire d'agir sur l'épaisseur de la couche de diélectrique supérieure.
- diminuer la « surface mouillée ».
- utiliser un matériau différent possédant une constante diélectrique plus faible. Toutefois, au vu de notre procédé de fabrication, cette dernière solution n'est pas envisagée.

La puce en silicium prise en exemple dans les Figures 55 et 56 présente une capacité de l'ordre de 250 pF (cette valeur dépend également des joints toriques utilisés qui définissent la « surface mouillée »). L'amplificateur de patch-clamp MultiClamp 700A dont nous disposons permet de compenser des capacités de substrats de 36 pF au maximum et n'est donc pas adapté pour caractériser de telles puces. J'ai donc réalisé les mesures de capacités par spectrométrie d'impédance.

4. Mesures de capacités par spectrométrie d'impédance

4.1. Principe de la mesure

Un potentiostat est un appareil dont le rôle est d'imposer une différence de potentiel constante entre une électrode de travail (WE) et une électrode de référence (RE), et de mesurer le courant traversant CE et WE. Ces mesures sont effectuées à plusieurs fréquences de travail et permettent d'identifier le schéma électrique équivalent du système étudié. La cellule de mesure d'un potentiostat comprend 4 connections (Figure 57):

- l'électrode de référence (REF)
- l'électrode auxiliaire (CE)
- l'électrode de travail (WE)
- la masse

Ce type d'appareil est très utilisé en électrochimie pour étudier le comportement d'électrodes. Pour notre application, nous n'avons besoin que de deux électrodes de mesure et pour cela, nous relierons les électrodes auxiliaire et de référence ensemble pour former la première électrode et utilisons comme deuxième électrode l'électrode de travail.

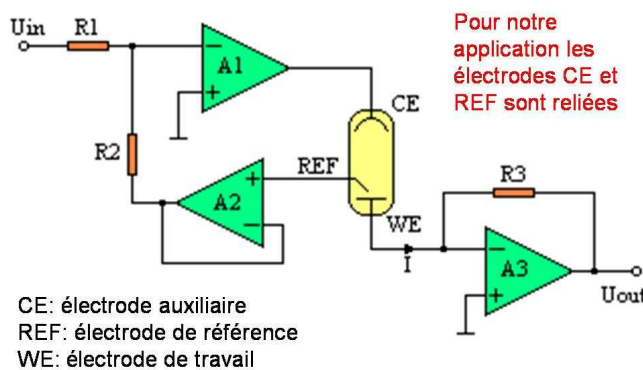


Figure 57 : principe d'un potentiostat à 3 électrodes. A1 est l'amplificateur de contrôle qui impose la tension désirée. L'amplificateur A2 mesure la différence entre l'électrode de référence et l'électrode de travail et permet à A1 de comparer cette tension à celle qu'il applique et de corriger si besoin. A3 est un amplificateur qui permet de convertir le courant en une tension mesurable.

Pour la mesure, le système est assemblé et « mis en eau » de la même manière que présenté dans le chapitre 2, et les électrodes du potentiostat sont reliées aux deux électrodes de part et d'autre du site de mesure. Nous utilisons un potentiostat/galvanostat 263A et détecteur de réponse fréquentielle (Frequency Response Detector 1025) de Princeton Applied Research. Les deux instruments sont pilotés par le logiciel associé PowerSuite et les données analysées à l'aide de ZSimpWin.

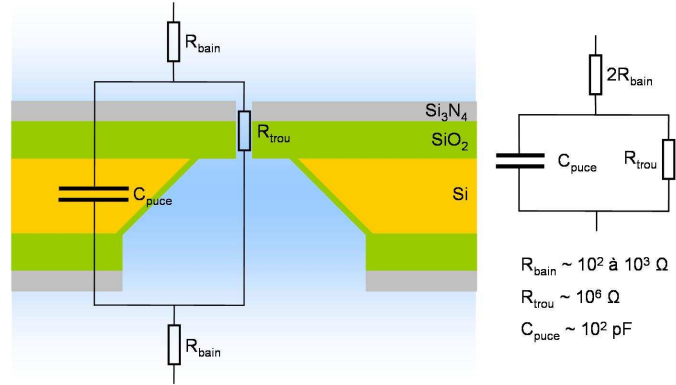
4.2. Identification et étude du modèle électrique équivalent

4.2.1. Schéma électrique équivalent du système sans échantillon biologique

En spectrométrie d'impédance, les mesures réalisées à plusieurs fréquences permettent de caractériser des circuits électriques complexes mettant en jeu des résistances, des capacités, des inductances en série ou en parallèle. Dans notre étude, la puce en silicium présente une capacité globale en parallèle avec la résistance du microtrou (sans cellule). Entre les électrodes Ag/AgCl et la puce se trouvent les chambres fluidiques inférieure et supérieure délimitées par les joints toriques. Ces deux réservoirs de fluide présentent une résistance que

l'on nommera R_{bain} , faible devant la résistance du microtrou (R_{bain} varie entre 10^2 et $10^3 \Omega$). La Figure 58 présente le circuit électrique ainsi formé, où la capacité de la puce C_{puce} et la résistance du microtrou R_{trou} sont en parallèle et en série avec les deux résistances de bain.

Figure 58 : circuit électrique équivalent de la puce silicium placée dans le système d'assemblage. C_{puce} est la capacité totale de la puce au niveau d'un site de mesure, R_{trou} est la résistance du microtrou et R_{bain} la résistance formée par le fluide dans les chambres supérieure et inférieure définies par les joints toriques. A droite, le circuit équivalent simplifié.



4.2.2. Signature électrique du modèle par spectrométrie d'impédance

En spectrométrie d'impédance, les résultats sont présentés sous la forme de diagrammes de Bode et de Nyquist. Le schéma électrique équivalent de notre système, identifié dans la Figure 58, possède une signature électrique théorique précise que je présente dans cette partie. Pour ce faire il faut tout d'abord déterminer l'impédance équivalente du circuit présenté dans la Figure 58, puis tracer les courbes des différents diagrammes.

L'impédance d'un tel circuit est donc :

$$Z_{eq} = \left[2R_{\text{bain}} + \frac{R_{\text{trou}}}{1 + (R_{\text{trou}} C_{\text{puce}} \omega)^2} \right] + j \left[\frac{-R_{\text{trou}}^2 C_{\text{puce}} \omega}{1 + (R_{\text{trou}} C_{\text{puce}} \omega)^2} \right] \quad \text{Équation 24}$$

et la phase correspondante :

$$\tan \varphi = \frac{R_{\text{trou}}^2 C_{\text{puce}} \omega}{(2R_{\text{bain}} + R_{\text{trou}}) + 2R_{\text{bain}} (R_{\text{trou}} C_{\text{puce}} \omega)^2} \quad \text{Équation 25}$$

Sur la Figure 59, on remarque que la phase présente un maximum, obtenu pour une pulsation ω :

$$\omega = \sqrt{\frac{2R_{\text{bain}} + R_{\text{trou}}}{2R_{\text{bain}} (R_{\text{trou}} C_{\text{puce}})^2}} \quad \text{Équation 26}$$

La valeur du maximum varie selon les valeurs des éléments R et C. On peut donc obtenir des courbes qui présentent un "pic" plus ou moins aigu se situant à une fréquence différente.

Le diagramme du module de l'impédance d'un tel circuit est représentatif d'un filtre passe-bas (Figure 59).

Le diagramme de Nyquist correspondant, qui représente la partie imaginaire en fonction de la partie réelle, se présente sous la forme d'un demi cercle (Figure 59), dont le diamètre est fixé par l'impédance basse fréquence ($R_{\text{trou}} + 2R_{\text{bain}}$) et l'impédance haute fréquence (R_{bain}). Ces valeurs se lisent donc à l'intersection du demi-cercle et de l'axe des abscisses. Au maximum de la courbe, l'équation suivante est vérifiée :

$$R_{\text{trou}} C_{\text{puce}} \omega = 1 \quad \text{Équation 27}$$

ce qui permet d'évaluer la valeur de C_{puce} .

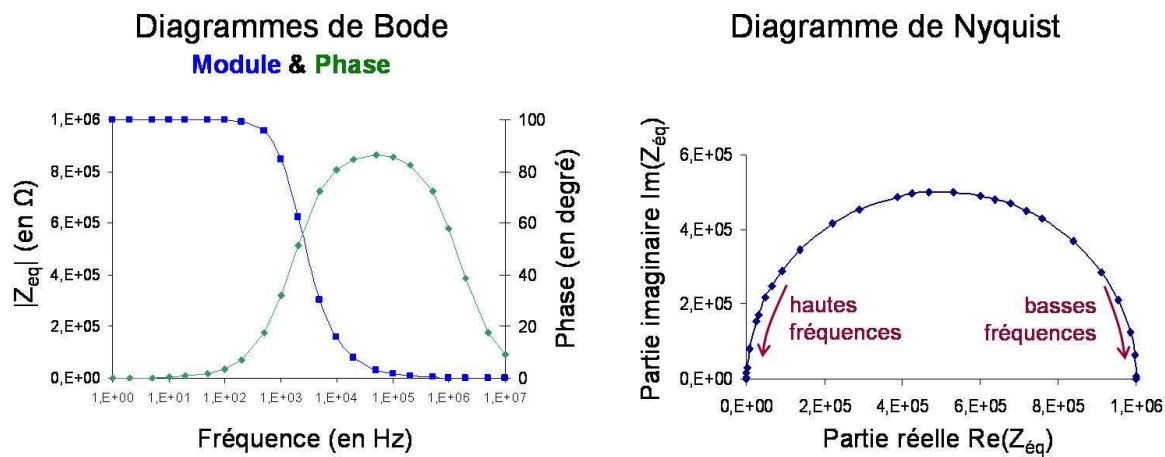


Figure 59 : diagrammes de Bode et de Nyquist théoriques pour un circuit électrique constitué d'une résistance R_{trou} en parallèle avec une capacité C_{puce} , en série avec 2 résistances R_{bain} (cf Figure 58). $R_{\text{trou}} = 1 \text{ M}\Omega$, $R_{\text{bain}} = 500 \Omega$, et $C_{\text{puce}} = 100 \text{ pF}$.

Le modèle électrique que forme notre assemblage, possède une signature électrique caractéristique qui, grâce à la spectrométrie d'impédance, permet de mesurer toutes les valeurs des différents composants. Les prédictions théoriques doivent être maintenant confrontées aux mesures expérimentales afin de valider le schéma électrique équivalent que nous avons prédit. Dans le cas simple de ce circuit RC, le diagramme de Nyquist permet de déterminer simplement et rapidement toutes les valeurs des composants des circuits et sera donc utilisé en priorité pour les calculs. La forme des diagrammes de Bode permettra de s'assurer que le circuit étudié est conforme au circuit RC prédit et constituera une preuve supplémentaire de l'adéquation entre théorie et expérience.

4.3. Validation du modèle, exemples de mesures de capacité

Les mesures de spectrométrie d'impédance que nous avons réalisées sur notre système sont conformes à la théorie du modèle de circuit RC comme peuvent l'illustrer les études ci-dessous que nous avons menées sur deux puces, choisies pour posséder des valeurs de capacités haute et basse : 260 et 30 pF. La première étude concerne une puce P1 (présentée dans le chapitre 3) composée d'une épaisseur de matériau de diélectrique de $2,12 \mu\text{m}$ sur les 2 faces et utilisée avec un joint torique de $3 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ (notation conventionnelle : diamètre interne du joint de 3 mm et diamètre de tore de 1 mm). La deuxième étude traite d'une puce

P4 composée d'une épaisseur de matériau de diélectrique de 8,62 μm sur les 2 faces et mise en œuvre avec un joint torique de 1,40 mm x 1,25 mm.

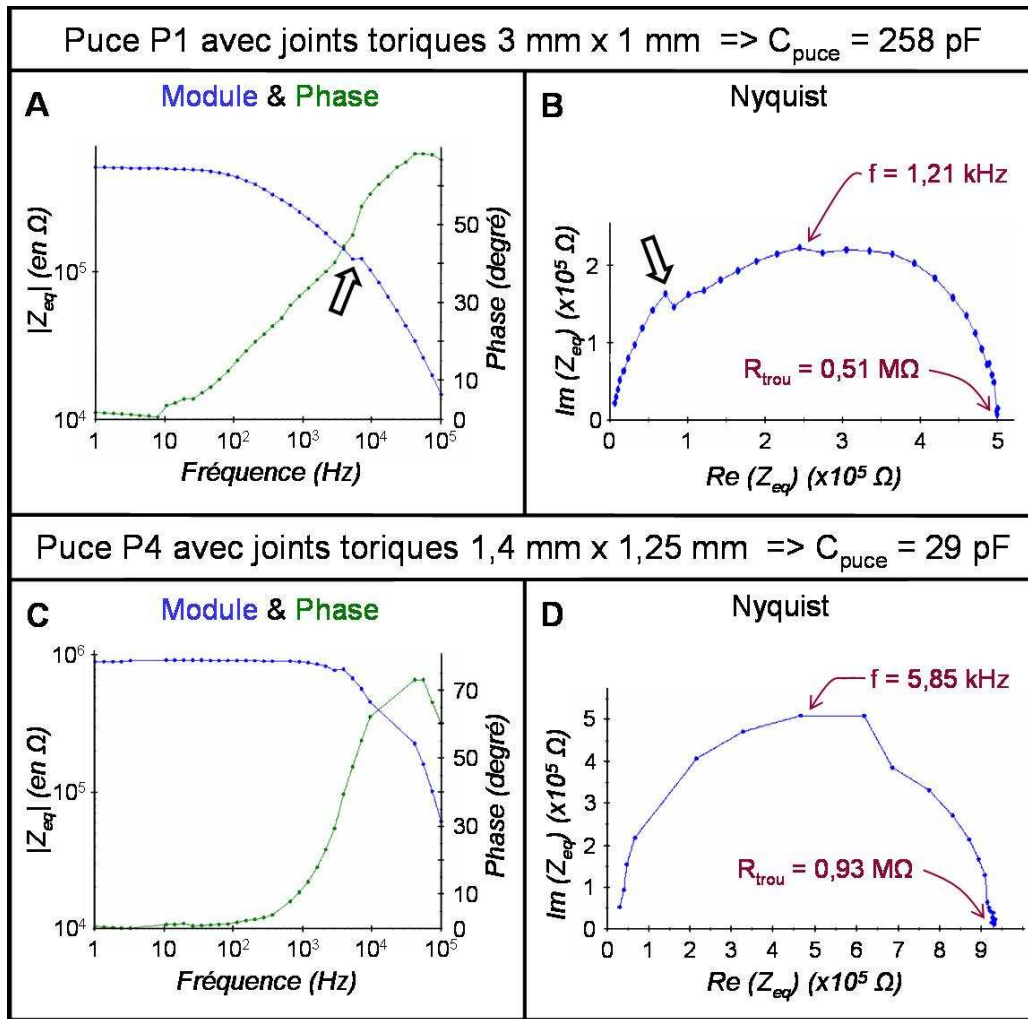


Figure 60 : étude de la capacité des puces par spectrométrie d'impédance. Les mesures d'impédance sont réalisées avec 40 points de fréquence répartis entre 100 kHz et 1 Hz et une amplitude du potentiel imposé de 50 mV. Deux types de puces sont étudiés ici : la puce P1 composée d'une épaisseur de matériau de diélectrique de 2,12 μm sur les 2 faces et mise en œuvre avec un joint torique de 3 mm x 1 mm, la puce P4 composée d'une épaisseur de matériau de diélectrique de 8,62 μm sur les 2 faces et utilisée avec un joint torique de 1,40 mm x 1,25 mm. Pour chacune de ces puces les diagrammes de Bode (A et C, module en bleu et phase en vert) et de Nyquist (B et D) sont présentés ; R_{trou} est la résistance du microtrou mesurée et f la fréquence pour laquelle la courbe du diagramme de Nyquist atteint son maximum. Le diagramme de Nyquist de la puce P1 permet de calculer une capacité $C_{\text{puce}} = 1/(R_{\text{trou}} \times 2\pi f) = 258 \text{ pF}$ (cf équation 11). Pour la puce P4 on mesure $C_{\text{puce}} = 29 \text{ pF}$.

Les courbes présentées dans la Figure 60 sont obtenues par des mesures d'impédance de notre système réalisées avec 40 points de fréquence répartis entre 100 kHz et 1 Hz et une amplitude du potentiel imposé de 50 mV. Les diagrammes de Bode (Figure 60 A et C) et de Nyquist (Figure 60 B et D) pour les deux types de puces sont présentés.

Dans les deux cas, on remarque que les courbes ont les formes attendues et déterminées théoriquement dans la partie précédente. Cependant, elles ne sont pas parfaites et présentent

en particulier un artefact (indiqué par une flèche sur les courbes A et B de la Figure 60) pour une fréquence haute proche de 10 kHz. Pour ces fréquences hautes (supérieures à 10 kHz), le système semble avoir un comportement légèrement différent de celui prévu (demi-cercle parfait pour le diagramme de Nyquist) que nous ne pouvons expliquer précisément ; nous supposons que cette particularité est due à des éléments de la connexion électrique et des électrodes formant un circuit RC en série avec celui identifié dans la Figure 58. Toutefois comme notre gamme de travail en patch-clamp se situe sur une bande de fréquence étroite, en dessous de ces fréquences, le faible écart par rapport à la théorie n'a pas fait l'objet d'une étude supplémentaire. Nous verrons également dans la suite que ces courbes permettent de calculer des valeurs de capacités expérimentales proches des valeurs théoriques. En théorie, dans le diagramme de Nyquist, le demi-cercle doit couper l'axe des abscisses à la valeur R_{bain} pour les hautes fréquences. On remarque que cette valeur est plus élevée que celle prédite dans la partie précédente : on obtient une résistance de 10 k Ω environ contre 1 k Ω prévu. Nous supposons en fait qu'une résistance formée par les connexions électriques et les électrodes sur le PCB s'ajoute à la résistance de bain.

Sur la courbe de Nyquist, en notant la résistance du microtrou (valeur à l'intersection du demi-cercle avec l'axe des abscisses) et la valeur de la fréquence pour laquelle le maximum est atteint (Figure 60 B et D), il est possible d'en déduire la valeur de la capacité de la puce étudiée (cf équation 27). Pour les exemples de la Figure 60, on obtient ainsi des capacités de 258 et 29 pF.

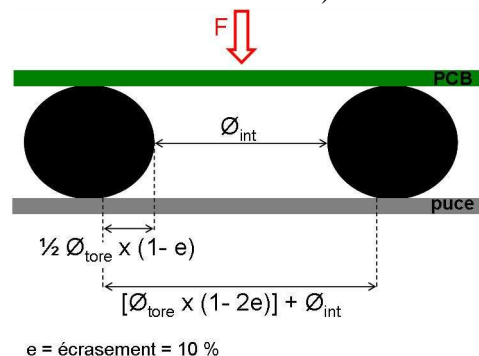
Cette étude nous permet de valider le schéma électrique équivalent de la puce placée dans le système d'assemblage déterminé dans la partie 4.2.1. Les résultats obtenus présentent une bonne adéquation avec les prédictions de la partie 4.2.2, et les mesures de spectrométrie d'impédance montrent tout leur intérêt pour mesurer les capacités de nos puces en silicium, qu'elles soient de valeurs importantes (258 pF) ou faibles (29 pF).

5. Réduction des capacités des puces

5.1. Réduction de la surface de contact des fluides

Les joints toriques utilisés initialement dans notre assemblage possédaient un diamètre interne de 3 mm et un diamètre de tore de 1 mm. Afin de réduire la capacité du site de mesure sur la puce en silicium, nous avons testé des joints toriques de diamètre interne plus faible pour diminuer la « surface mouillée » sur la puce. La limite minimale de taille pour le joint torique est fixée par l'existence commerciale du joint d'une part et par l'écartement des deux capillaires traversant les électrodes Ag/AgCl sur le PCB d'autre part. Ainsi nous avons testé des joints toriques de 2 mm x 1 mm et de 1,4 mm x 1,25 mm (le plus petit possible adapté à notre assemblage et comportant la dureté souhaitée d'environ 70 Shore A).

Figure 61 : calcul du diamètre du disque de fluide en contact avec la puce lors de l'utilisation d'un joint torique de diamètre interne \varnothing_{int} et de diamètre de tore $\varnothing_{\text{tore}}$. L'écrasement e est donné par le fabricant, et dans notre cas, $e = 10\%$.



Il faut noter que lors de l'utilisation d'un joint torique 3 mm x 1 mm par exemple, la surface de fluide en contact avec la puce n'est pas un disque de 3 mm de diamètre, mais de diamètre (3 + 0,8) mm (Figure 61).

Les résultats présentés dans le Tableau 11 montrent l'évolution de la capacité d'une puce de type P1 utilisée avec 3 types de joints toriques différents. Les résultats expérimentaux sont comparés aux valeurs théoriques calculées en tenant compte de toutes les capacités selon le schéma de la Figure 56 (schéma de gauche).

<i>Joint torique</i>	<i>« Surface mouillée » (mm²)</i>	<i>Capacité mesurée (pF)</i>	<i>Capacité corrigée (pF)</i>	<i>Capacité théorique (pF)</i>
3 mm x 1 mm	11,3	258 ± 22	253 ± 22	239
2 mm x 1 mm	6,2	153 ± 15	148 ± 15	135
1,4 mm x 1,25 mm	4,4	115 ± 7	110 ± 7	105

Tableau 11 : diminution de la capacité de la puce en fonction de la surface de fluide en contact avec la surface du matériau diélectrique. La « surface mouillée » est calculée selon les indications de la Figure 61. L'erreur sur les capacités mesurées dépend de la méthode de mesure et de l'exploitation des courbes. La capacité corrigée prend en compte la capacité des connexions électriques en amont de la puce ; elle est obtenue en retranchant 5 pF à la valeur mesurée. Les valeurs théoriques sont calculées de manière exacte selon le schéma de gauche de la Figure 56.

On constate que la capacité mesurée ne correspond pas exactement à la capacité théorique. D'une part, les capacités mesurées sont faibles, et la méthode de mesure engendre une erreur souvent supérieure à 10% de la valeur mesurée. D'autre part, dans notre étude nous avons omis de prendre en compte la capacité des éléments en amont de la puce en silicium (assemblage et connexions électriques) comprise entre 5 et 10 pF. Nous avons donc reporté dans le Tableau 11 une capacité « corrigée » (capacité mesurée à laquelle on a retranché la capacité des connexions électriques et des éléments en amont de la puce, ici 5 pF). On note alors que les valeurs de capacité « corrigée » sont conformes aux valeurs théoriques.

5.2. Augmentation de l'épaisseur de matériau diélectrique et renforcement de la couche d'oxyde sur les faces de la gravure humide

L'étude de l'épaisseur du matériau sur la capacité de la puce a été réalisée sur les trois types de puces P1, P3 et P4, possédant des empilements différents d'isolant (décrites dans le chapitre 3). Les différentes couches de matériau diélectrique entrant dans la constitution de ces puces sont listées dans le Tableau 12.

<i>Type de puce</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>
<i>Couches de matériau diélectrique en faces supérieure et inférieure</i>	2 µm SiO ₂ TEOS 0,12 µm Si ₃ N ₄ LPCVD	2 µm SiO ₂ TEOS 0,12 µm Si ₃ N ₄ LPCVD 1,5 µm de SiO ₂ PECVD	7 µm SiO ₂ TEOS 0,12 µm Si ₃ N ₄ LPCVD 1,5 µm de SiO ₂ PECVD

Tableau 12 : caractéristiques des puces étudiées pour la diminution de la capacité en terme d'épaisseur des différents matériaux diélectriques utilisés. Les types de puces notés P1, P3 et P4 correspondent aux puces détaillées dans le chapitre 3.

J'ai réalisé les mesures de capacités de ces puces avec les plus petits joints toriques utilisables avec notre système d'assemblage, soit 1,4 mm x 1,25 mm. Le Tableau 13 compare les valeurs expérimentales obtenues par spectrométrie d'impédance, la valeur de capacité corrigée (cf partie précédente, 5.1) et les valeurs théoriques (calculées de manière exacte selon le schéma de gauche de la Figure 56).

<i>Puce</i>	<i>Capacité mesurée (pF)</i>	<i>Capacité corrigée (pF)</i>	<i>Capacité théorique (pF)</i>
P1	115 ± 15	110 ± 15	105
P3	54 ± 6	49 ± 6	45
P4	29 ± 4	24 ± 4	20

Tableau 13 : diminution de la capacité des puces silicium grâce à l'augmentation de l'épaisseur des différentes couches de matériau diélectrique. Les caractéristiques des puces P1, P3 et P4 sont présentées dans le Tableau 12.

On constate tout d'abord la bonne adéquation entre les valeurs théoriques et expérimentales. Les capacités des puces P3 et P4 sont nettement plus faibles que celle de la puce P1. Afin de comprendre cette différence revenons sur des étapes du procédé de fabrication des puces : les dépôts de SiO₂ TEOS et de Si₃N₄ LPCVD sont réalisés au début du procédé de fabrication avant la réalisation de toutes les gravures ; pour les puces P3 et P4, un dépôt de SiO₂ PECVD est réalisé à la dernière étape du procédé sur les deux faces de la puce. Tout d'abord, ce dépôt permet de diminuer la capacité des couches d'isolant de la face supérieure. Ensuite, il augmente l'épaisseur d'oxyde sur les faces de la gravure humide en face inférieure de la puce ce qui contribue à diminuer la capacité globale de la puce également. En effet, nous avons vu dans le paragraphe A.3.2 de ce chapitre que la faible épaisseur d'oxyde sur les faces de cette gravure (entre 10 et 20 Å d'oxyde natif) constitue une capacité importante qui court-circuite la capacité constituée par les couches d'isolant en face inférieure de la puce. Grâce au dépôt de 1,5 µm de SiO₂ PECVD en face inférieure nous pensons avoir recouvert les faces de la gravure d'environ 0,7 µm d'oxyde (travaux internes au LETI), ce qui a contribué à diminuer la capacité totale de la puce.

6. Discussion

6.1. Réduction du bruit dans les mesures

La réduction de la surface de fluide en contact avec la puce en silicium, ainsi que l'augmentation des épaisseurs d'oxyde déposées sur les faces supérieure et inférieure nous ont permis d'obtenir des puces en silicium avec des capacités d'environ 20 pF. A titre de comparaison, rappelons que les puces en silicium développées par la société Sophion Biosciences possèdent une capacité de 50 pF.

La faible valeur de capacité obtenue doit rendre possible la mesure de la capacité de la membrane cellulaire d'une part (car C_{puce} est du même ordre de grandeur que C_{membrane}), et permettre de réduire le bruit généré par le système d'assemblage lors des mesures de courant d'autre part. Le Tableau 14 présente des mesures de bruit rms réalisées à l'aide de l'amplificateur de patch-clamp. Le système de patch-clamp est placé dans la cage de Faraday présentée dans le chapitre 2, et les valeurs de bruit sont relevées pour deux gains

d'amplification (correspondant aux résistances de rétroaction 500 M Ω et 50 G Ω) en connectant successivement différents éléments (connecteur en Téflon et système de patch-clamp) à la tête d'amplification. Notons que le connecteur Téflon que nous avons développé ne génère pas de bruit supplémentaire. Les résultats du Tableau 14 montrent que c'est l'assemblage « mis en eau » qui constitue la source majoritaire de bruit quel que soit le gain de l'amplificateur utilisé. Lors de l'utilisation d'une puce à la capacité de 250 pF on constate que le bruit total est de 71,8 pA alors qu'il diminue à 16,6 pA avec une puce de 25 pF (pour une résistance de rétroaction de 500 M Ω , utilisée lors des enregistrements de courants en configuration cellule entière, et un filtre passe-bas à 10 kHz). Cette réduction du bruit sur la mesure valide les deux solutions mises en œuvre pour la diminution de la capacité.

<i>Éléments connectés à la tête d'amplification</i>	<i>Résistance rétroaction (gain)</i>	
	<i>500 MΩ</i>	<i>50 GΩ</i>
<i>Tête d'amplification seule</i>	0,60 pA _{rms}	0,22 pA _{rms}
<i>+ connecteur Téflon</i>	0,60 pA _{rms}	0,22 pA _{rms}
<i>+ assemblage MultiPatch</i>	1,08 pA _{rms}	0,84 pA _{rms}
<i>+ assemblage MultiPatch « en eau » (avec $C_{puce} \sim 25$ pF)</i>	16,6 pA _{rms}	4,80 pA _{rms}
<i>+ assemblage MultiPatch « en eau » (avec $C_{puce} \sim 250$ pF)</i>	71,8 pA _{rms}	nd

Tableau 14 : Courant de bruit (valeur rms) généré par les différents éléments connectés successivement à la tête d'amplification. Le bruit est mesuré pour deux gains d'amplification, l'un utilisé pour les mesures en cellule entière (résistance de rétroaction de 500 M Ω), l'autre pour les mesures en cellule attachée (résistance de rétroaction de 50 G Ω). nd : non déterminé, saturation de l'amplificateur.

6.2. Réduction de la capacité : limites et solutions potentielles

6.2.1. Augmenter l'épaisseur de matériau diélectrique

Pour réduire la capacité des puces, nous avons déposé du SiO₂ PECVD sur les faces supérieure et inférieure de la puce. Cependant, cette méthode possède une limite, puisque le dépôt, réalisé en fin de procédé, modifie les caractéristiques du pore et l'épaisseur de matériau déposé doit garantir des caractéristiques de microtrou compatibles avec l'obtention de « gigaseals ». De plus, sur la puce de type P4, les 7 μ m de SiO₂ TEOS déposés au début du procédé de fabrication constituent une limite de faisabilité. Il n'est donc pas envisageable d'augmenter encore l'épaisseur des différents oxydes sans altérer les propriétés du microtrou, et nous pouvons considérer que la réduction de la capacité de la puce selon cette méthode est maximum.

Durant la durée de mes travaux de thèse, nous avons exploré des solutions alternatives pour réduire les capacités des puces en ajoutant des couches d'isolant n'altérant pas les caractéristiques du microtrou. Pratiquement, la couche d'isolant est déposée sur la face supérieure de la puce et une ouverture d'une centaine de micromètres de diamètre est ensuite réalisée afin de « libérer » le microtrou et le rendre accessible aux cellules. Cette capacité supplémentaire C_{sup} s'ajoute en série et en parallèle des autres capacités (Figure 62). Deux types de matériaux isolants ont été testés : un film polymère et un dépôt de SiO₂. Ces solutions, testées sur des puces non décrites dans ce manuscrit, n'ont pas été exploitées avec des cellules mais représentent des pistes prometteuses.

Matériau polymère

Le film de polyimide utilisé est un film sec généralement utilisé pour les procédés de photolithographie [120]. Après avoir réalisé des ouvertures circulaires de 100 μm de diamètre, le film d'une épaisseur de 50 μm est laminé sur la puce en silicium. Cette technique permet de diminuer la capacité de la puce étudiée de 400 pF à 30 pF.

SiO₂ PECVD

Cette étude a été réalisée sur une puce utilisée dans un projet partenaire reposant sur le même principe de mesure (cf chapitre 5) et ne comportant qu'une seule couche de Si₃N₄ de 0,2 μm d'épaisseur sur ses faces inférieure et supérieure. La capacité d'une telle puce est très importante, de l'ordre de 2 nF. Un dépôt de 1,5 μm de SiO₂ PECVD est réalisé sur la face supérieure de la puce et une gravure de 100 μm de côté est ensuite réalisée au travers de la couche au niveau du microtrou. Ce procédé permet ainsi de diminuer la capacité de la puce à 95 pF.

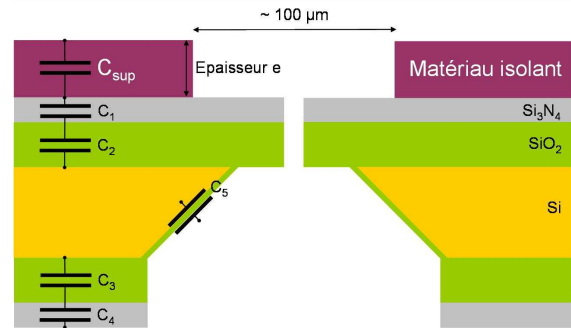


Figure 62 : capacités des différentes couches de matériaux isolants sur la puce suite à l'ajout d'une couche supplémentaire. La couche d'isolant supplémentaire (polymère ou oxyde de silicium) possède une épaisseur e et présente une ouverture d'environ 100 μm au niveau du microtrou.

6.2.2. Réduire la « surface mouillée »

La réduction de la « surface mouillée » permet de réduire la capacité totale de la puce. Toutefois, cette alternative atteint rapidement elle aussi ses limites, puisque notre assemblage ne permet pas d'utiliser de joints toriques plus petits que 1,4 mm x 1,25 mm.

Dans la suite du projet nous avons envisagé le développement d'une arrivée planaire des fluides évitant l'utilisation de joints toriques. Cette alternative, en diminuant la surface de fluide en contact de la puce, réduira la capacité de la puce. Par cette technique, Pantoja *et al* montrent qu'ils réduisent la capacité de leur puce à 17 pF en utilisant des canaux microfluidiques microstructurés dans du PDMS [99].

B. Validation biologique sur des modèles de canaux ioniques utilisables en criblage.

1. Introduction

Dans cette partie, je présente plusieurs enregistrements de canaux ioniques (IRK1, hERG et BK(Ca) inductibles) obtenus grâce à la réduction de la capacité des puces et à l'augmentation des résistances de scellement (cf chapitre 3).

Ces améliorations ont permis en effet de palier à certains problèmes que nous avons identifiés dans le chapitre 2 :

- un système trop bruyeux et donc peu sensible.
- la difficulté d'accéder à la capacité membranaire.
- un rendement de scellements trop faible (20 % de scellements supérieurs à 100 M Ω , et 4 % de gigaseals) et des scellements peu stables mécaniquement.

2. Canaux IRK1

2.1. Amélioration de la qualité des enregistrements

L'optimisation des scellements des cellules sur nos puces en silicium (chapitre 3), a permis d'obtenir des enregistrements de meilleure qualité et de réaliser des courbes dose-réponse. La réduction des courants de fuite est en effet bien illustrée sur le modèle des canaux IRK1, exprimés de manière stable sur des cellules CHO.

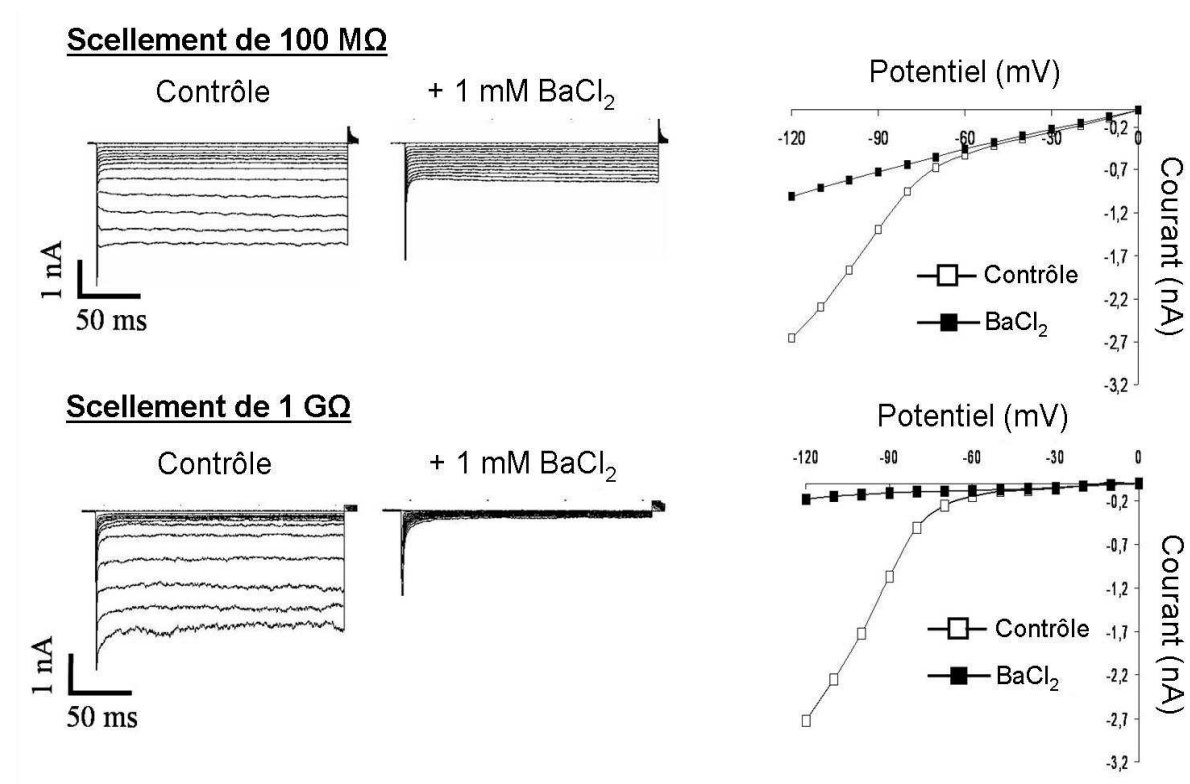


Figure 63 : Courants potassiques enregistrés en cellule entière sur cellules CHO exprimant de manière stable les canaux IRK1. Ces courants rectifiants entrants ont été enregistrés en réponse à des potentiels de 0 à -120 mV (incrément de -10 mV) en patch-clamp planaire. Deux enregistrements sont comparés : un enregistrement réalisé avec une résistance de scellement de 100 M Ω , déjà présenté dans le chapitre 2, et un enregistrement réalisé avec une résistance de scellement de 1 G Ω obtenue avec les puces développées grâce aux travaux de l'étude de l'interaction cellule/microtrou (chapitre 3). Dans les deux cas l'activation des canaux est mise en évidence (traces de gauche), puis l'effet bloquant du Baryum est démontré (traces du milieu). A droite, les courbes courant-tension sont obtenues à partir des traces précédentes.

Les canaux potassiques sont soumis à des potentiels de 0 à -120 mV (par des incréments de -10 mV) sur une durée de 200 ms. La Figure 63 compare les enregistrements obtenus avec un scellement de 100 M Ω , présenté dans le chapitre 2, et un scellement de 1 G Ω réalisé sur une puce optimisée (chapitre 3). Dans chaque cas, les canaux sont activés (à partir de -60 mV d'après les courbes courant-tension) puis inhibés par 1 mM de baryum (inhibiteur non spécifique). Le courant mesuré après l'ajout du baryum n'est autre que le courant de fuite dû au scellement imparfait (sachant que 1 mM de baryum inhibe la totalité des canaux). Le courant de fuite étant beaucoup plus faible avec l'utilisation des nouvelles puces, l'activation et l'inhibition (par 1 mM de Ba²⁺) des canaux est beaucoup plus franche.

2.2. Stabilité des scellements, courbes dose-réponse

Les scellements obtenus sont désormais des « gigaseals » dans 55% des cas ; en configuration cellule entière, ces scellements restent stables pendant plus de 20 minutes et autorisent des changements de solutions successifs sur une même cellule. Cette stabilité mécanique au cours du temps est illustrée par la courbe dose réponse du baryum sur les canaux IRK1 (Figure 64) [115]. Nous mesurons les courants activés par un potentiel de -80 mV suite à l'ajout successif, dans la chambre supérieure, de 5 concentrations de baryum : 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM et 10 mM. La courbe présentée dans la Figure 64 est la courbe moyenne obtenue suite à des enregistrements réalisés sur 5 cellules différentes. Elle permet de calculer une IC₅₀ pour le baryum de $72 \pm 17 \mu$ M. Cette valeur est conforme aux ordres de grandeurs trouvés dans la littérature sur les canaux IRK1 [121].

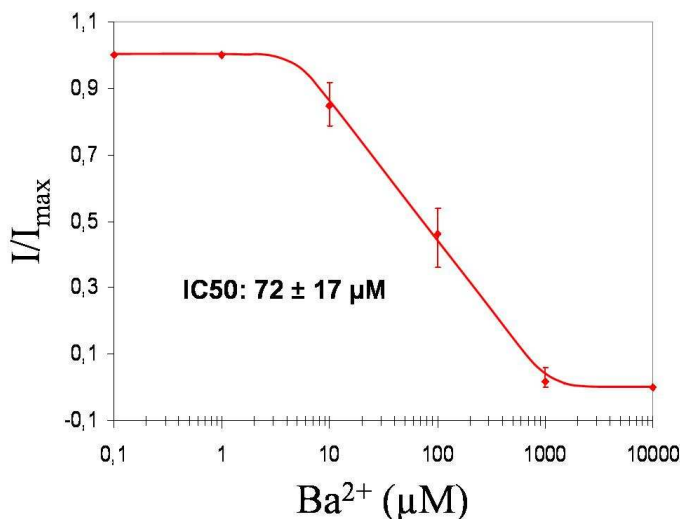


Figure 64 : courbe dose-réponse du baryum sur les canaux IRK1 (exprimés sur cellules CHO). La courbe présentée est une moyenne réalisée sur 5 mesures. L'IC₅₀ calculée vaut $72 \pm 17 \mu$ M. I est le courant mesuré en présence de la concentration de Ba²⁺ indiquée sur l'axe des abscisses, I_{\max} est le courant mesuré sans Ba²⁺.

3. Validation biologique sur les canaux hERG

3.1. Intérêt des canaux hERG en pharmacologie

Les canaux hERG ont été décrits dans le chapitre 1 comme des canaux d'intérêt majeur pour les industries pharmaceutiques. En effet, depuis 1998 plus de la moitié des médicaments qui ont été retirés du marché l'ont été parce qu'ils créent des troubles du rythme cardiaque

(syndrome du QT long). Ces substances sont en réalité des bloqueurs des canaux potassiques hERG. Ainsi la recommandation des agences américaine et européenne est que dorénavant l'affinité pour le canal hERG de toute nouvelle entité chimique soit évaluée par les techniques d'électrophysiologies moléculaires avant toute administration à l'homme [122]. Nous avons souhaité démontrer la robustesse et la pertinence de notre système avec l'analyse de ces canaux pour des applications pharmacologiques.

De plus, les canaux hERG possèdent une conductance unitaire plus faible (~12 pS) que les canaux BK(Ca) (~250 pS) et IRK1 (~30 pS) précédemment étudiés et cette nouvelle phase de validation est désormais permise grâce aux « gigaseals » et à la diminution de la capacité des puces.

3.2. Enregistrements des courants hERG sur la puce en silicium

Les canaux potassiques hERG possèdent des propriétés de voltage dépendance qui font d'eux des canaux très adaptés au contrôle de la phase de repolarisation, et donc de la durée des potentiels d'action cardiaques. Ainsi ils présentent des inactivations rapides couplées avec de lentes activations lorsque que le potentiel passe rapidement d'une valeur négative (-80 mV) à un potentiel de dépolarisation (+60 mV), par exemple lors de l'augmentation du potentiel d'action. La conséquence de ce comportement est qu'un faible courant hERG circule pendant les phases de plateau (dépolarisation) du potentiel d'action. Cependant comme la membrane commence à s'hyperpolariser, les canaux hERG s'inactivent en passant par un état ouvert avant de se fermer. Il en résulte une augmentation passagère du flux sortant d'ions potassium (qui se manifeste par un « courant de queue »), entraînant la repolarisation de la membrane et l'arrêt du potentiel d'action [123].

De nombreuses molécules de référence sont connues pour causer l'inactivation des canaux hERG et font donc l'objet d'études pour caractériser les performances des automates de patch-clamp planaire existants [85, 86, 94]. Pour notre validation, nous avons choisi d'utiliser la Terfénadine comme inhibiteur de ces canaux.

La Figure 65 présente un enregistrement typique de canaux hERG en configuration cellule entière, réalisé sur notre puce. Le protocole de potentiel imposé présente un potentiel de repos négatif à -80 mV, puis une phase de dépolarisation à 60 mV pendant 1 seconde, et enfin des phases de repolarisation de 40 mV à -100 mV pendant 3 secondes. Les traces de courant présentées dans cette figure (en bas à gauche) traduisent la phase d'inactivation des canaux durant la phase de repolarisation. L'ajout de 100 nM de Terfénadine provoque l'inhibition totale des canaux comme le montrent les traces de courant en bas à droite. Enfin, les deux courbes courant-tension (en haut à droite) mettent en évidence le courant de queue et l'inhibition des courants par la Terfénadine en accord avec les résultats obtenus en patch-clamp conventionnel [124].

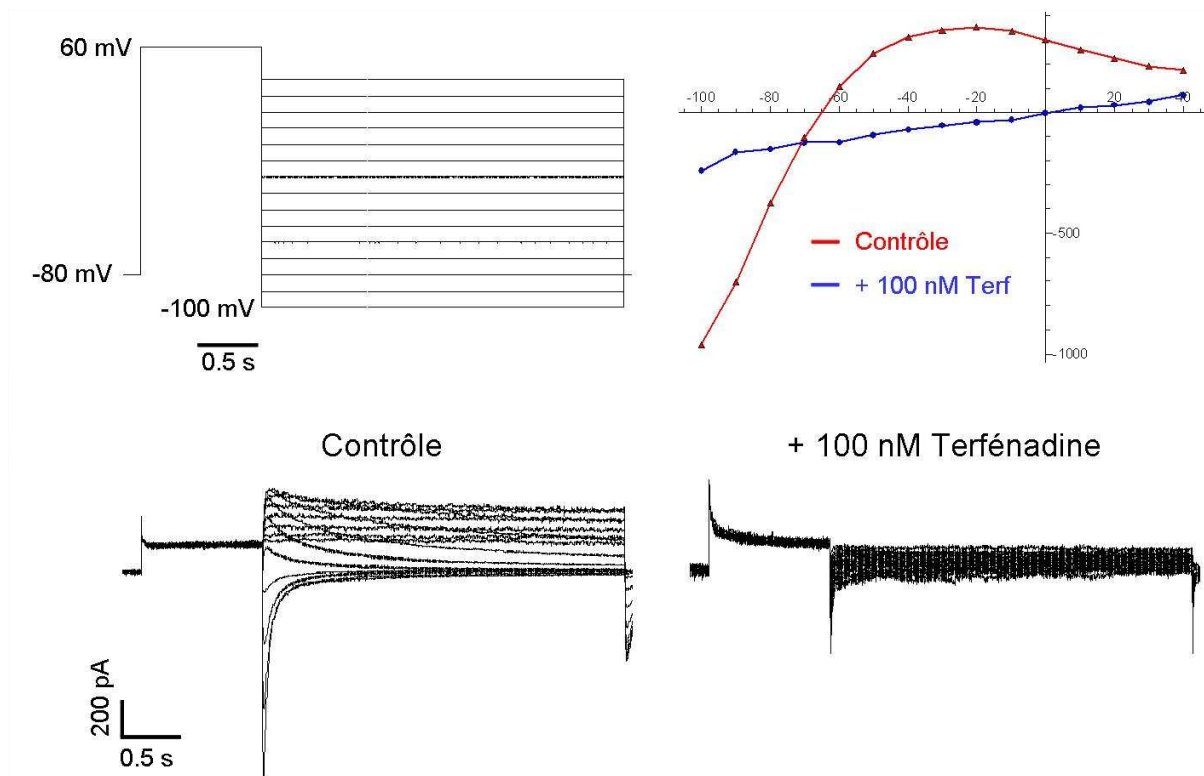
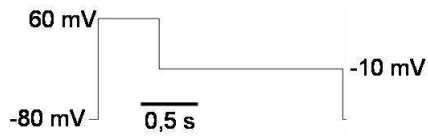


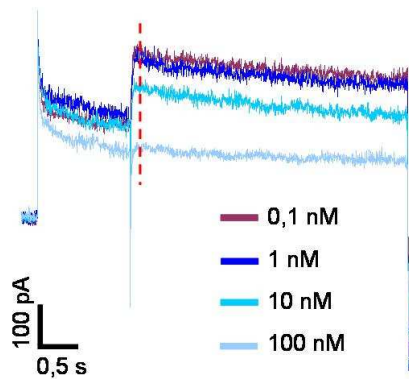
Figure 65 : courants potassiques enregistrés en cellule entière sur cellules HEK exprimant de manière stable les canaux hERG. Ces courants rectifiants entrants ont été enregistrés en réponse au protocole de potentiel présenté en haut à gauche. Les traces de courant en bas montrent l'activation (à gauche) puis l'inhibition des courants par 100 nM de Terfénadine (Terf) (à droite). Les courbes courant-tension en haut à droite sont obtenues à partir des deux traces de courant à un temps $t = 1,2$ s.

La Figure 66 illustre la détermination de la concentration IC_{50} de la Terfénadine sur ces canaux hERG. Sur chaque cellule, différentes concentrations de Terfénadine sont ajoutées successivement : 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, et 1000 nM. La Figure 66 B témoigne de l'inhibition progressive des canaux en fonction de la concentration (l'effet de la concentration 1000 nM n'est pas montré pour des soucis de lisibilité du graphe). Pour les concentrations élevées en Terfénadine, la totalité des canaux est inhibée, le courant mesuré est alors le courant de fuite. Enfin, ces enregistrements permettent de tracer la courbe dose réponse (Figure 66 C) et de déterminer une IC_{50} de 13 ± 4 nM. Cette valeur est conforme à celles trouvées dans la littérature en patch-clamp conventionnel (entre 7 et 204 nM, [116]), et est une des plus faibles déterminée en patch-clamp planaire (100 nM pour Molecular Devices [116], 11 nM pour Nanion [125]) ce qui illustre la grande sensibilité de notre prototype.

A: Protocole appliqué



B: Inhibition du courant



C: Courbe dose/réponse

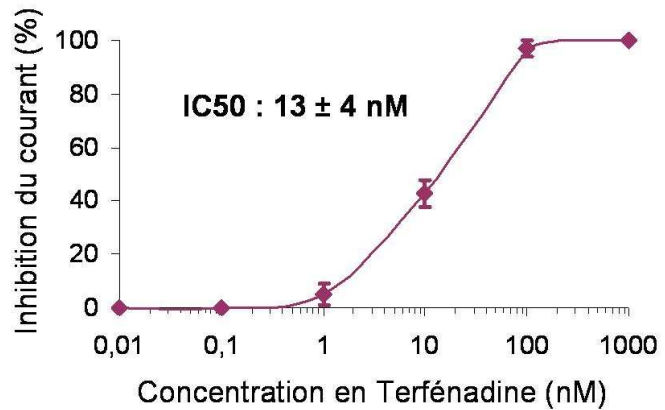


Figure 66 : détermination d'une IC50 de la Terfénadine sur les canaux hERG : A : protocole de tension appliquée pour mesurer le courant en cellule entière. B : superposition des traces de courants mesurés après l'ajout successif de Terfénadine à différentes concentrations sur une même cellule. C : courbe dose réponse tracée en calculant le pourcentage d'inhibition au temps signalé par le trait en pointillé sur la figure B. La courbe, déterminée à partir de n=2 cellules, donne une IC50 de 13 ± 4 nM.

Cette nouvelle étape de validation démontre la robustesse du système et sa capacité à tester en configuration cellule entière tous types de canaux voltage-dépendants, avec une sensibilité de quelques centaines de picoampères.

4. Mesure de capacité membranaire, exemple des canaux BK(Ca) T-Rex

4.1. Présentation de la lignée inductible BK(Ca) T-rer

Comme dans tout système cellulaire d'expression hétérogène, le niveau d'expression des canaux n'est pas contrôlé et l'amplitude des courants mesurés peut varier d'une cellule à l'autre. Afin d'enrichir la validation de notre système nous avons étudié une quatrième lignée cellulaire stable dont l'expression des canaux BK(Ca) se fait sous le contrôle d'un promoteur inductible [126]. Brièvement, l'expression des canaux est contrôlée par la compétition entre une protéine répresseur Tetracycline et l'ajout exogène de Tetracycline (Tet). En absence de Tet, le répresseur Tet est lié à l'opérateur Tet et l'expression de la protéine canal est bloquée. Lorsque les cellules sont incubées, avant la mesure, en présence de Tet, la protéine répresseur Tet libère l'opérateur Tet et l'expression de la protéine canal BK(Ca) est induite (Figure 67).

1. Le répresseur Tet (TetR) est exprimé dans les cellules en culture (à partir du pcDNA6/TR).
2. L'homo dimère TetR se lie à l'opérateur (TetO2), séquences dans le vecteur d'expression inducible, empêchant la transcription du gène d'intérêt.
3. La Tétracycline (Tet) ajoutée de manière exogène se lie aux homo dimères TetR.
4. La liaison de Tet à TetR engendre un changement conformationnel de TetR qui se détache des séquences de l'opérateur TetO2, et induit la transcription du gène d'intérêt.

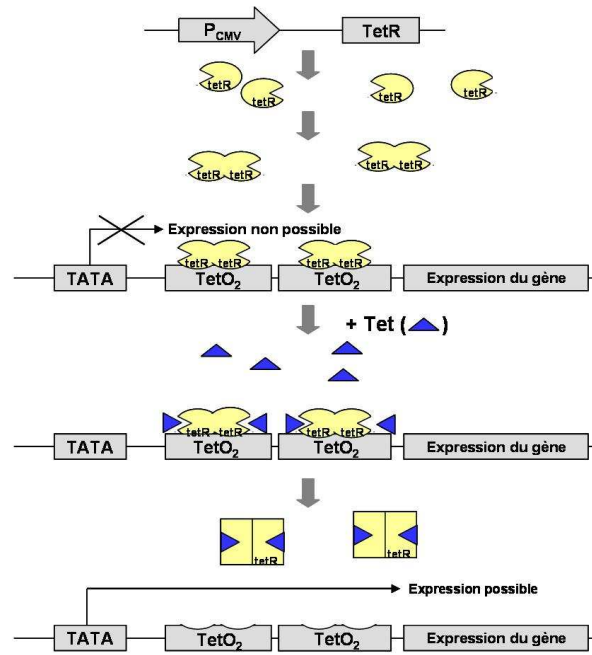


Figure 67: schéma de principe du système d'expression inducible sous contrôle de la Tétracycline.

4.2. Etude de l'induction de l'expression des canaux BK(Ca) par la Tétracycline

Afin d'enregistrer des courants ioniques de différentes amplitudes sur un même modèle cellulaire, nous avons suivi et enregistré le niveau d'expression des canaux en fonction du temps d'incubation des cellules avec la Tétracycline.

La réduction de la capacité de la puce rend désormais possible la normalisation du courant mesuré selon la taille de la cellule. Rappelons que la capacité de la membrane cellulaire est proportionnelle à sa surface, et par conséquent, normaliser le courant par rapport à la capacité de la membrane revient à donner une densité de courant surfacique (et donc d'évaluer le niveau d'expression du canal sur la membrane cellulaire).

La Figure 68 illustre la dépendance de la quantité de courant, et donc du niveau d'expression des canaux, en fonction du temps d'incubation des cellules en présence de Tet. Les courants mesurés en cellule entière, normalisés, augmentent en fonction de la durée d'incubation. Les données issues du patch-clamp conventionnel et planaire, comparées aux temps courts et longs, montrent une bonne adéquation [119].

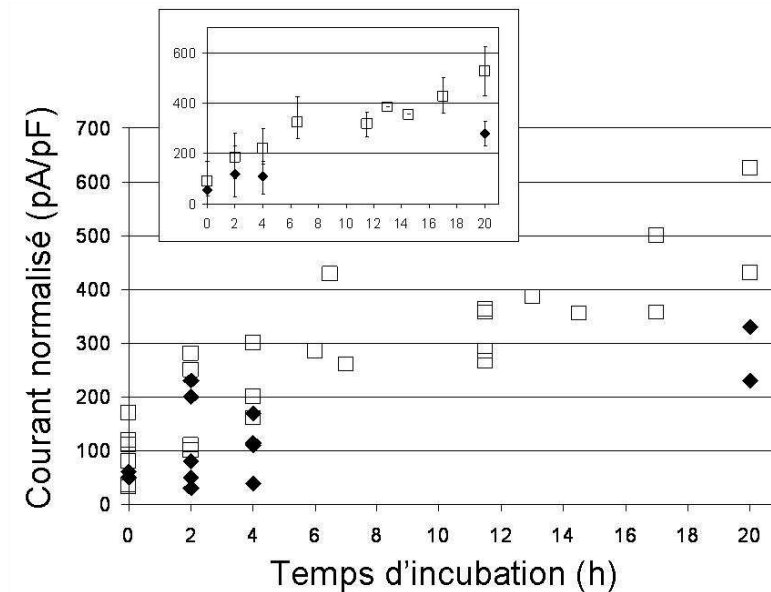


Figure 68: augmentation de l'expression des canaux BK(Ca) en fonction du temps d'incubation des cellules à la Tétracycline (Tet). Les courants sont enregistrés sur des cellules CHO exprimant les canaux ioniques BK(Ca) de manière inductible en patch-clamp conventionnel (◆) et en patch-clamp planaire (□). L'amplitude des courants est mesurée pour une dépolarisation de 120 mV et est représentée en fonction du temps d'incubation à la Tet. Les courants sont normalisés, chaque point correspondant à une mesure sur une cellule. Le graphe en encart représente la valeur moyenne des courants mesurés à des temps d'incubation donnés.

Le modèle de canaux inductibles est assez original et n'a jamais jusqu'à présent été utilisé pour valider un système de patch-clamp planaire. Cette lignée permet d'obtenir différents niveaux d'expression des canaux, et de choisir ainsi le niveau de courant potassique souhaité selon les applications envisagées : pour des mesures à l'échelle du canal unique, on se placera à des temps d'incubation très courts ou nuls, et pour des mesures de forts courants, on se placera à des temps d'incubation très longs.

Cette étude permet de vérifier que notre système autorise des mesures de courants faibles, de l'ordre de la centaine de pA (à un temps d'incubation à la Tétracycline nul, par exemple). Enfin et surtout, ces résultats sont la preuve que, grâce aux efforts d'optimisation de la puce en silicium, les mesures de capacités membranaires sont réalisables.

C. Du démonstrateur au prototype de laboratoire

1. Performances de la puce en silicium

Résumons ici les performances acquises :

- Une étude de l'interaction cellule/microtrou a tout d'abord permis de concevoir une puce en silicium offrant 55 % de « gigaseals », plus de 80 % de scellements exploitables pour des mesures en cellule entière et stables pendant plus de 20 minutes, avec un taux de

passage en cellule entière de plus de 65 %. Ces fortes valeurs de scellement et leur grande stabilité ont permis de mesurer des courants faibles et de réaliser des courbes dose réponses en particulier pour des applications en criblage pharmacologique (canaux hERG)

- Enfin la capacité d'un site de mesure réduite à 25 pF et compensable par le circuit de compensation de notre amplificateur de patch-clamp, permet d'accéder à la capacité de la membrane de la cellule et à la résistance d'accès comprise en général entre 6 et 10 M Ω . Ceci est illustré par la normalisation des courants sur une lignée cellulaire inductible (canaux BK(Ca) T-Rex).

Les validations électrophysiologiques présentées ici nous permettent donc d'affirmer que la puce silicium répond aux critères pour être intégrée dans un automate.

2. Limites du système d'assemblage

A ce jour, les performances de la puce en silicium ont été portées au niveau d'exigence fixé au début du projet. L'assemblage développé au cours de ces travaux possède la particularité d'être adaptable à tout type de puce et convient parfaitement à l'optimisation du support de travail, la puce. Cependant, lors de la lecture de ce manuscrit nous avons montré plusieurs fois que le système d'assemblage constituait le facteur limitant à l'amélioration des résultats (comme la réduction de la capacité d'un site de mesure).

Bien qu'adapté à des applications pharmacologiques, le système proposé reste de mise en œuvre très manuelle et lente, tant pour le montage que pour la gestion de la fluidique. La disposition des 18 joints toriques nécessaires au système est fastidieuse et le montage du système demande encore entre 10 et 15 minutes. La fluidique au format capillaire montre elle aussi ses limites et n'est pas adaptée à une automatisation. Les capillaires utilisés sont encombrants et fragiles et demandent une grande minutie d'utilisation. Pour finir, la gestion des fluides et de l'aspiration sont entièrement manuelles : l'injection des fluides se réalise à l'aide d'une seringue (et d'un pousse-seringue éventuellement) et d'une micropipette pour les solutions de la chambre supérieure, et l'aspiration se pratique à la bouche ou grâce à une colonne d'eau constituant un réservoir de pression.

Afin d'exploiter au mieux les performances de la puce que j'ai développée, il apparaît nécessaire de disposer d'un automate fonctionnel robuste à la prise en main rapide, et donc adapté à un utilisateur final.

Chapitre 5 : Vers un prototype de laboratoire

A. Parallélisation et automatisation du système

1. Introduction

1.1. Objectif

L'objectif du projet dans lequel s'est inscrit ma thèse est de développer un capteur automatisé et parallélisé de courants ioniques permettant d'effectuer des tests en série sur canaux ioniques. Mes travaux ont permis de développer une puce en silicium (et son système d'assemblage) performante tant pour les rendements de « gigaseals » atteints que pour la sensibilité des mesures. Afin de promouvoir et de valoriser ce nouvel outil, des développements technologiques doivent être mis en œuvre pour transformer ce démonstrateur de faisabilité en véritable prototype de laboratoire dédié au transfert. L'utilisateur final disposera ainsi d'un outil qu'il pourra piloter informatiquement via une interface conviviale et pourra manipuler de façon automatique un procédé jusqu'alors manuel et répétitif. Les retombées pour cet utilisateur en seront un meilleur rendement de tests, du fait de la parallélisation des mesures, un gain de temps, du fait de la simplification de la mise en œuvre et une meilleure reproductibilité, du fait de la standardisation du procédé.

L'intégration et l'automatisation du procédé actuel de mesure permettront d'atteindre cet objectif. Cela nécessite un programme de développement en terme d'instrumentation que j'ai initié en partenariat avec la société Bertin Technologies [100].

1.2. « Grandes lignes » du cahier des charges

La conception de cet automate a été envisagée sur la base de deux modules : un nouveau système d'assemblage permettant de mettre en œuvre la puce en silicium développée au cours de mes travaux avec une arrivée planaire et collective de fluides (appelé module 1), et un module (module 2) de gestion des fluides et des pressions par une IHM (Interface Homme Machine).

Le système d'assemblage doit répondre à plusieurs critères énoncés ci-dessous :

- conservation d'un assemblage type « sandwich ». De cette façon, seule la puce en silicium constituera le consommable.
- observation sous microscope des sites de mesures. Cette caractéristique est très importante pour la mise au point du protocole de positionnement et d'aspiration des cellules, voire plus tard pour l'observation de cellules fluorescentes.
- arrivée planaire des fluides sur la puce pour permettre la visualisation des sites de mesure, réduire l'encombrement du système et les volumes utilisés.
- indépendance fluidique et électrique de chacun des 9 sites de mesure.
- adaptabilité du système à tout amplificateur commercial de patch-clamp présent dans les laboratoires.
- mise en place du système dans une cage de Faraday standard de patch-clamp.

Le module de commande de l'automate doit lui aussi remplir plusieurs conditions :

- le pilotage des électrovannes et des pressions doit pouvoir se réaliser de manière soit manuelle soit programmable.
- le logiciel développé doit relever en temps réel la valeur de la résistance de scellement calculée par le logiciel de l'amplificateur, de manière à asservir l'aspiration.

A ce jour, le module 1 a été fabriqué et installé au laboratoire et plusieurs tests ont été effectués. La validation complète de ce module (recette) conditionne la réalisation du deuxième module dont le cahier des charges est déjà bien défini (cf partie 3 ci-après).

2. Système d'assemblage

2.1. Présentation du système

2.1.1. Assemblage mécanique

La Figure 69 présente le nouvel assemblage développé pour l'automatisation de notre système de patch-clamp planaire. Il est constitué de quatre éléments:

- la puce en silicium placée au cœur du système.
- deux cartes fluidiques en PDMS de part et d'autre de la puce permettant d'acheminer les fluides au niveau des microtrous sur la puce. Les solutions circulent dans des microcanaux structurés dans le PDMS. Nous reviendrons en détail sur la conception de ces plaques dans la partie A.2.2 de ce chapitre.
- deux plaques de verre comportant les électrodes annulaires Ag/AgCl ainsi que les pistes électriques isolées. Ces plaques disposées directement contre les cartes fluidiques permettent de refermer les microcanaux. Elles sont percées d'orifices où des capillaires sont fixés de manière à alimenter les microcanaux des cartes fluidiques.
- deux supports en acier inoxydable sont finalement placés sur chaque face de l'assemblage. Une couche d'élastomère (1 mm d'épaisseur) placée entre les plaques de verre et les plaques d'inox permet d'appliquer une force de serrage importante entre les parties inférieure et supérieure sans risquer de briser ou de rayer la plaque de verre.

Afin d'exploiter les deux voies de mesure de notre amplificateur (Axon MultiClamp 700A), deux têtes de pré-amplification peuvent être connectées en parallèle sur deux sites de mesure. Ceci permettra de valider sur deux cellules la parallélisation de la formation des scellements et de l'enregistrement des courants ioniques.

Dans sa première version, le prototype présente un système de serrage manuel. L'effort appliqué sur les plaques de PDMS engendre l'écrasement partiel ou total des microcanaux et modifie donc leur dimension, voire les bouche. Afin de s'assurer que les solutions circulent selon le même débit sur une carte fluidique et de façon reproductible d'une expérience à l'autre, il est important d'appliquer un écrasement homogène sur toute la surface de l'assemblage. Or, contrairement aux joints toriques que nous utilisons dans le démonstrateur précédent, et qui présentent une épaisseur bien définie, les cartes de PDMS possèdent une épaisseur de 1,5 mm pouvant varier de $\pm 10\%$. Il est donc nécessaire de contrôler la force appliquée aux quatre coins de l'assemblage. La manière la plus économique et la plus simple, proposée par Bertin, est d'utiliser des ressorts de constante de raideur connue, placés aux angles de l'assemblage et de contrôler leur longueur d'écrasement pour connaître la force totale appliquée.

Dans une version plus aboutie, le système de serrage sera revu afin d'être plus convivial (serrage pneumatique avec retour de force, par exemple).

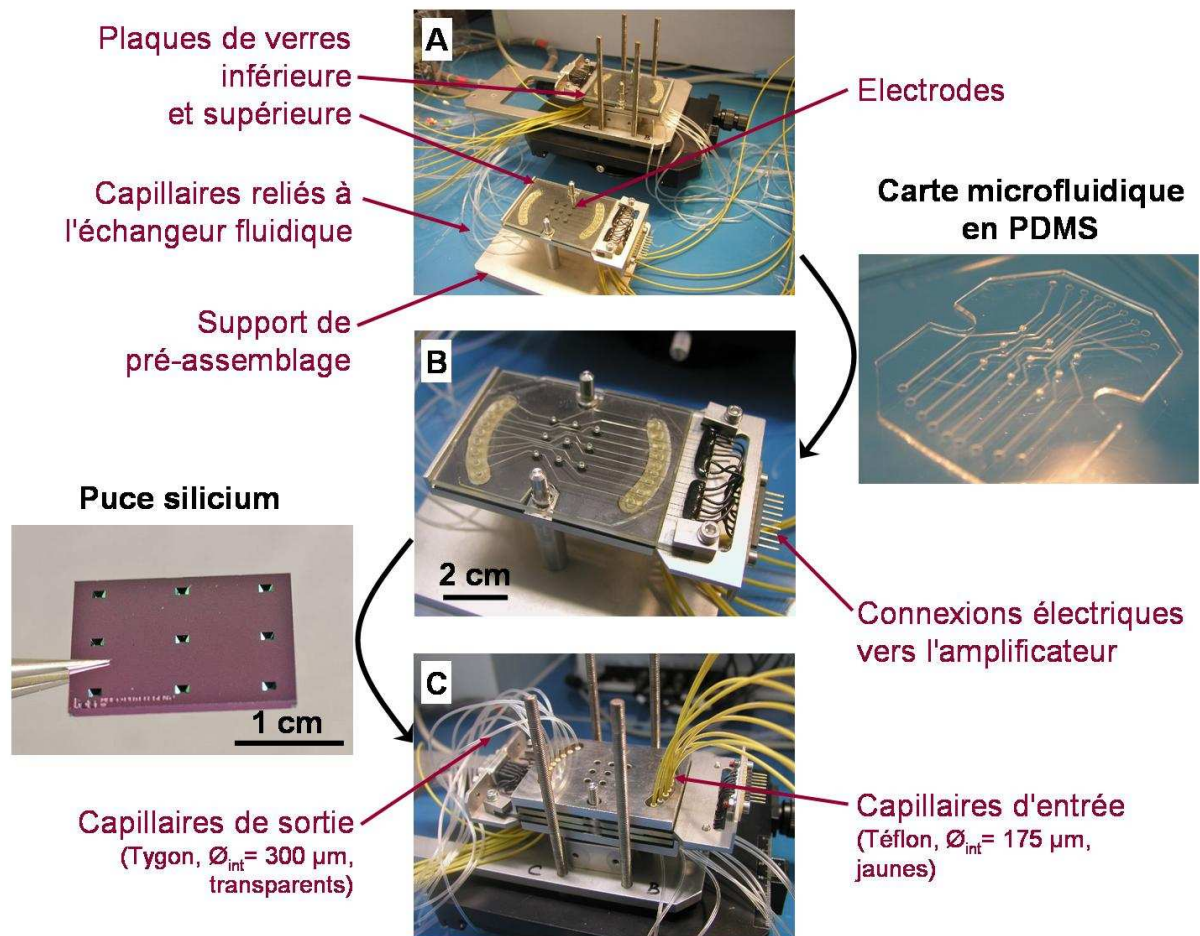


Figure 69 : présentation du système d'assemblage. Le système est composé de deux plaques de verres inférieure et supérieure, comportant des électrodes Ag/AgCl annulaires et équipées de capillaires (A). Une carte de microfluidique en PDMS, dans laquelle des canaux sont microstructurés, est disposée sur chaque plaque de verre (B). La puce en silicium est placée sur la carte microfluidique de l'étage inférieur et les deux étages sont assemblés (C).

2.1.2. Echangeur fluide

Le système dispose de 9 sites de patch-clamp indépendants avec pour chaque chambre fluide inférieure et supérieure une entrée et une sortie de fluide. Deux types de liquides peuvent être dispensés :

- les liquides classiquement utilisés comme l'eau, les solutions électrophysiologiques, l'éthanol, etc., stockés dans les bouteilles de 500 mL mises sous pression.
- les liquides précieux (comme les drogues et la suspension cellulaire) injectés avec des seringues via des vannes manuelles situées au plus près de l'assemblage.

Au total pour chaque partie (inférieure et supérieure) trois arrivées de fluides sont réparties sur neuf entrées fluidiques vers les sites de mesures. A la sortie du système d'assemblage les fluides sont évacués vers une poubelle (Figure 70 A). Des échangeurs fluidiques permettent

de répondre à cette demande. Ils sont constitués d'une pièce en PEEK (Poly-EtherEtherKetone), sur laquelle tous les capillaires sont connectés via des électrovannes (pour la première phase de ce projet, les électrovannes sont pilotées manuellement grâce à un boîtier de contrôle) (Figure 70).

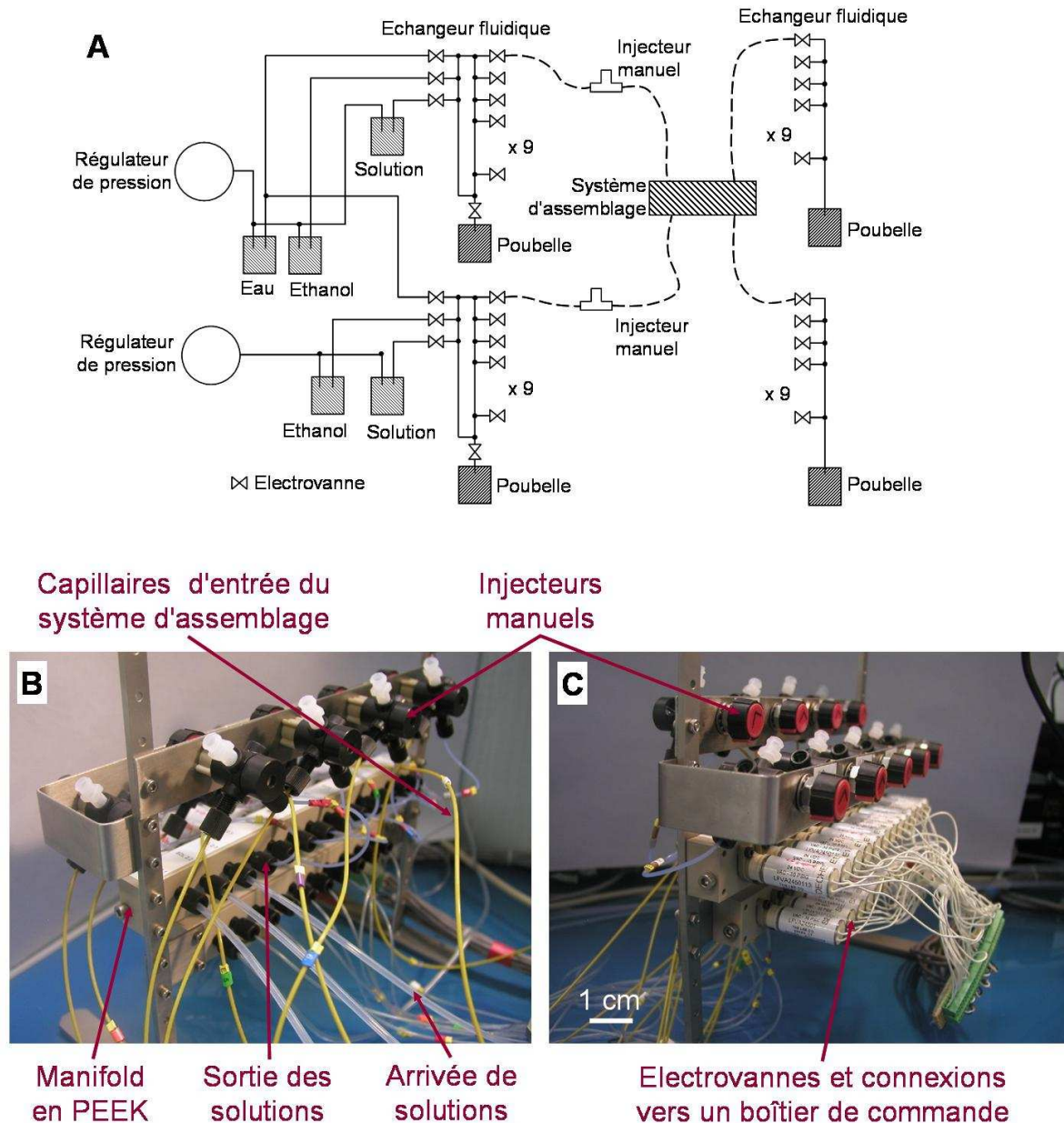


Figure 70 : gestion des fluides de l'automate. A : schéma de principe du circuit fluidique. B et C : photos des échangeurs fluidiques. L'arrivée dans l'échangeur en PEEK des solutions de remplissage (milieux électrophysiologiques, eau, éthanol...) se fait par les capillaires en Téflon transparents (B). Le fluide passe ensuite par des électrovannes (C), puis ressort de l'échangeur pour alimenter le système de mesure via les capillaires en Téflon jaune (B). Entre la sortie de l'échangeur et l'entrée dans le système d'assemblage sont insérés des injecteurs manuels (B et C) pour permettre de dispenser les solutions précieuses.

2.2. Choix technologiques

2.2.1. Electrodes

Comme le montre la Figure 69, les neuf électrodes d'argent sont disposées sur les deux plaques de verre. A ce jour, l'automate n'a pu être testé électriquement puisque les électrodes fabriquées ne sont pas stables : lors de la chloration, le précipité AgCl se détache de la surface, emportant avec lui l'argent. Dès la première utilisation, la couche d'argent a été éliminée, laissant le chrome (couche d'accroche) en contact direct avec les solutions électrophysiologiques. En concertation avec la société Bertin nous avons cherché à identifier la cause de ce désagrément. Après plusieurs tests et recherche bibliographique, il s'avère que la méthode de dépôt de l'argent est en cause. En effet les électrodes ont été déposées sur la couche de chrome en phase vapeur. Or certaines études font remarquer que des électrodes obtenues par électrodéposition sont plus stables [127]. D'ailleurs, les électrodes des circuits imprimés utilisés dans le démonstrateur que j'ai conçu sont déposées également par voie électrochimique. De nouvelles plaques de verre sont donc en cours de fabrication et permettront de caractériser le système électriquement et de le tester avec des cellules.

2.2.2. Cartes fluidiques

Les cartes comportant les microcanaux sont réalisées en PDMS (Figure 69), matériau très utilisé en microfluidique [128, 129]. En effet le moulage du PDMS est particulièrement intéressant pour le prototypage rapide et se fait par une méthode de réplcation. La technique la plus standard consiste à réaliser un moule en matériau dur avec une résine photosensible négative de type époxy, comme le SU-8, sur une plaque de silicium. Le PDMS et son agent réticulant sont ensuite versés sur le moule. Après réticulation, on obtient par démoulage un objet représentant la structure en négatif du moule. Le caractère élastomérique du PDMS facilite l'étanchéité des connections fluidiques, et cette propriété a largement motivé le choix de ce matériau pour notre système. En effet, il permet de réaliser aisément l'arrivée planaire des fluides tout en jouant le rôle de joint d'étanchéité au niveau de la puce silicium, remplaçant les joints toriques (Figure 71).

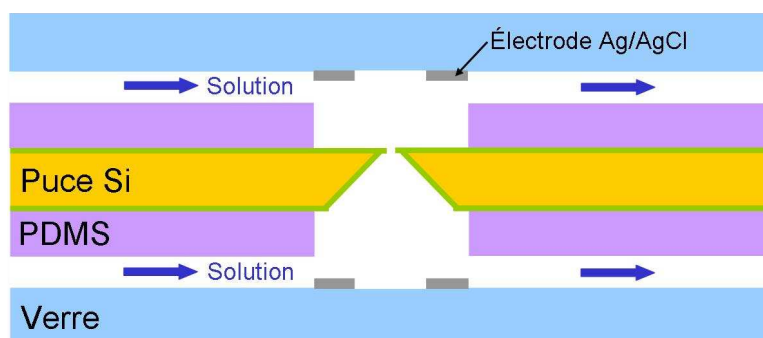


Figure 71 : coupe transverse du système au niveau d'un site de mesure. La carte en PDMS permet de faire circuler planairement les fluides et joue le rôle de joint au niveau de la puce silicium.

Cependant les propriétés du PDMS appellent quelques remarques et engendrent quelques limitations [128, 129]. Le PDMS est un matériau perméable au gaz. Si cette propriété est utile au remplissage des canaux pour éviter la présence de bulle, elle contre-indique l'utilisation d'une dépression dans les canaux risquant d'entraîner la formation de bulles. Or, pour attirer

une cellule sur un microtrou, nous avons vu précédemment qu'une aspiration est pratiquée au niveau de la chambre fluide inférieure. Nous avons donc décidé de travailler avec des surpressions dans les chambres inférieure et supérieure, et de positionner la cellule en appliquant, par exemple, la pression atmosphérique à la partie inférieure et une pression légèrement supérieure dans la chambre supérieure.

Le PDMS, hydrophobe, est également perméable à de nombreux solvants non polaires, comme la plupart des inhibiteurs utilisés en électrophysiologie. Afin d'éviter l'adsorption de ces molécules sur les parois des microcanaux et de risquer un relargage des composés durant les mesures suivantes, il est possible de traiter la surface des canaux afin de la rendre moins poreuse et/ou plus hydrophile (traitement UV/Ozone [130], dépôts de parylène [131]...).

Enfin, les propriétés du PDMS réticulé ne sont pas stables. Il existe des effets de vieillissement difficiles à anticiper. Dans notre cas, l'écrasement prolongé et la circulation de solutions diverses vont induire un vieillissement de la carte fluide. Ces cartes présenteront donc une utilisation réduite dans le temps, et constitueront une pièce jetable, dans un nombre d'utilisations à définir.

Malgré ces inconvénients, qui nous l'avons vu peuvent être contournés, le PDMS reste un matériau de choix pour la phase de test de notre prototype.

2.2.3. Matériaux pour la fluide et électrovannes

Les matériaux utilisés pour la conception du circuit fluide doivent résister à de nombreuses solutions comme les solutions salines et l'éthanol, mais surtout doivent présenter des propriétés limitant au maximum les risques d'adsorption de molécules hydrophobes. Nous avons opté pour l'utilisation de PEEK et de Téflon, matériaux présentés comme inertes et résistants à la grande majorité des produits.

Outre les considérations d'adsorption de molécules, les volumes utilisés doivent être réduits au maximum. L'utilisation d'électrovannes constitue la source majeure de consommation de volume. En effet, s'il existe de nombreux modèles d'électrovannes présentant des volumes morts quasi nuls, la plupart des électrovannes possèdent des volumes de remplissage non négligeables. Nous avons choisi d'utiliser une électrovanne de marque LEE présentant un des volumes de remplissage les plus faibles (~20 μL). Ce volume s'ajoute à celui du chemin fluide constitué des capillaires et de l'échangeur fluide pour représenter un volume total de plus de 100 μL . Afin d'économiser le volume de molécules précieuses à injecter dans les chambres de mesure, nous avons inséré, entre les électrovannes et le système, une vanne manuelle au plus près du système (Figure 70). Nous utilisons des vannes 4 voies, de marque Upchurch, possédant un volume mort nul et un volume de remplissage quasi nul.

2.2.4. Gestion des pressions

La pression appliquée sur les fluides distribués doit être :

- 1) assez importante pour remplir de système entier en 1 à 2 minutes,
- 2) suffisamment faible et précise pour positionner la cellule et réaliser le scellement,
- 3) très réactive avec des temps de montée rapide pour appliquer le pulse de pression nécessaire au passage en configuration cellule entière.

Ces critères imposent l'utilisation de régulateurs de pression (régulateurs de la société SMC, pilotables par une tension 0-24 V) offrant une gamme de pression de 0 à 1 bar et une sensibilité inférieure à 10 mbar.

2.3. Performances

2.3.1. Vieillessement des cartes PDMS

Nous avons évoqué précédemment le vieillissement du matériau. Nous avons déterminé au cours des tests de fluidique que la carte microfluidique est utilisable en moyenne sept fois de suite. Au-delà, certains canaux se bouchent partiellement ou totalement et/ou la carte n'adhère plus suffisamment à la plaque de verre causant des fuites, ceci étant très certainement dû à la présence de poussières. Ainsi nous connaissons désormais la fréquence d'utilisation optimale des cartes en PDMS.

2.3.2. Performances fluidiques

En appliquant une pression de 800 mbar, il est possible de remplir le système entier en moins d'une minute avec des débits de 3 à 4 $\mu\text{L}/\text{sec}$. De plus, les capillaires utilisés en amont de l'échangeur fluidique possèdent un diamètre interne 10 fois plus important que celui des capillaires utilisés en aval, ce qui permet de conserver un débit constant quel que soit le nombre de sites de mesures alimentés simultanément.

Enfin, nous avons mesuré le volume nécessaire en solutions précieuses afin d'alimenter une chambre fluidique. De la vanne manuelle jusqu'au site de mesure, le chemin fluidique représente 20 μL en moyenne. Cette valeur est très faible si nous la comparons aux volumes utilisés en patch-clamp conventionnel, souvent de l'ordre du ml.

3. Pilotage du système

3.1. Fonctions du logiciel

Le logiciel développé devra permettre de piloter les électrovannes et les pressions appliquées. L'utilisateur pourra, au choix, contrôler un cycle de mesure en temps réel ou définir des cycles automatiques, qui à la suite de l'injection manuelle des cellules, réaliseront successivement la capture de la cellule, son scellement sur le microtrou et le passage en configuration cellule entière.

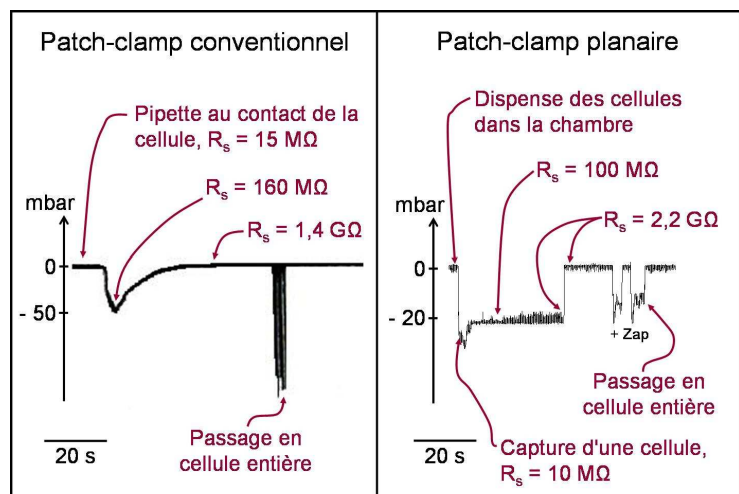
Cette automatisation de la phase de scellement nécessite que le logiciel puisse récupérer les informations de résistance de scellement et de capacité calculées par le logiciel de l'amplificateur. Pour la plupart des amplificateurs commerciaux il est possible de récupérer ces informations soit directement, soit comme pour des amplificateurs de marque Axon grâce à un programme informatique qui lit les « Telegraphs », informations analogiques des valeurs de gains et des différentes capacités utilisées, transitant entre l'amplificateur et la carte d'acquisition.

3.2. Asservissement de la pression selon la résistance de scellement

Une automatisation du processus de capture de la cellule jusqu'au passage en configuration cellule entière requiert un asservissement de la différence de pression appliquée en fonction de la valeur de la résistance de scellement et de la capacité mesurée. Afin d'anticiper sur la boucle d'asservissement à prévoir, nous avons connecté des capteurs de pression sur notre poste de patch-clamp planaire ainsi que sur un poste de patch-clamp conventionnel¹¹.

La Figure 72 présente des diagrammes types de pression obtenus en patch-clamp conventionnel et en patch-clamp planaire. Au début de l'expérience, nous pensions que la pression négative appliquée varierait sensiblement d'une expérience à l'autre. Or, il s'avère que les diagrammes de pression pour chacune des méthodes (planaire et conventionnelle) sont reproductibles, ce qui est de bon augure pour le développement d'une boucle d'asservissement simple. Par contre, entre les 2 approches les diagrammes présentent des profils différents ; nous supposons que cette différence de cycle de pression vient de la différence des chemins fluidiques utilisés dans les deux techniques et des types cellulaires. Cependant il est intéressant de remarquer que dans les deux cas, l'ordre de grandeur des pressions utilisées est le même.

Figure 72 : diagrammes types de l'aspiration pratiquée en patch-clamp conventionnel et planaire. Cellules utilisées : neurones d'hippocampe de souris pour le patch-clamp conventionnel et CHO pour le planaire. R_s est la résistance de scellement relevée à des temps donnés. Le passage en cellule entière est réalisé par simple pulse d'aspiration pour la technique conventionnelle ; pour la technique planaire un Zap est couplé à l'application d'une aspiration quasi constante.



Dans le cas du patch-clamp planaire, la dépression appliquée dans la chambre inférieure augmente jusqu'à la capture de la cellule sur le microtrou. Cette phase est très rapide, inférieure ou de l'ordre de la seconde, et lors de la capture de la cellule la résistance mesurée passe instantanément à plus de 10 MΩ. La pression est alors maintenue constante (entre -20 et -40 mbar suivant les cas) jusqu'à l'obtention du « gigaseal ». Une fois cette valeur obtenue, l'aspiration est relâchée et le passage en cellule entière peut avoir lieu. Pour ce faire des pulses de pressions de -50 à -100 mbar sont appliqués sur des durées très brèves, inférieures à la seconde (cas du patch-clamp conventionnel dans la Figure 72). Si un Zap est couplé à l'aspiration, la pression appliquée est plus faible, de l'ordre de -20 mbar sur une durée plus longue (cas du patch-clamp planaire dans la Figure 72).

¹¹ Poste de Christophe Arnoult, électrophysiologiste du laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies du CEA Grenoble.

La reproductibilité des diagrammes de pression nous permet d'ores et déjà de prévoir la boucle d'asservissement qu'il faudra mettre en place (Figure 73). La dépression devra augmenter jusqu'à la capture d'une cellule, se traduisant par une augmentation soudaine de la résistance mesurée. La pression sera alors maintenue constante jusqu'à ce que le scellement devienne un « gigaseal ». Pour le passage en cellule entière deux solutions se présenteront : appliquer un pulse d'aspiration très bref, ou appliquer une faible aspiration constante couplée à un Zap.

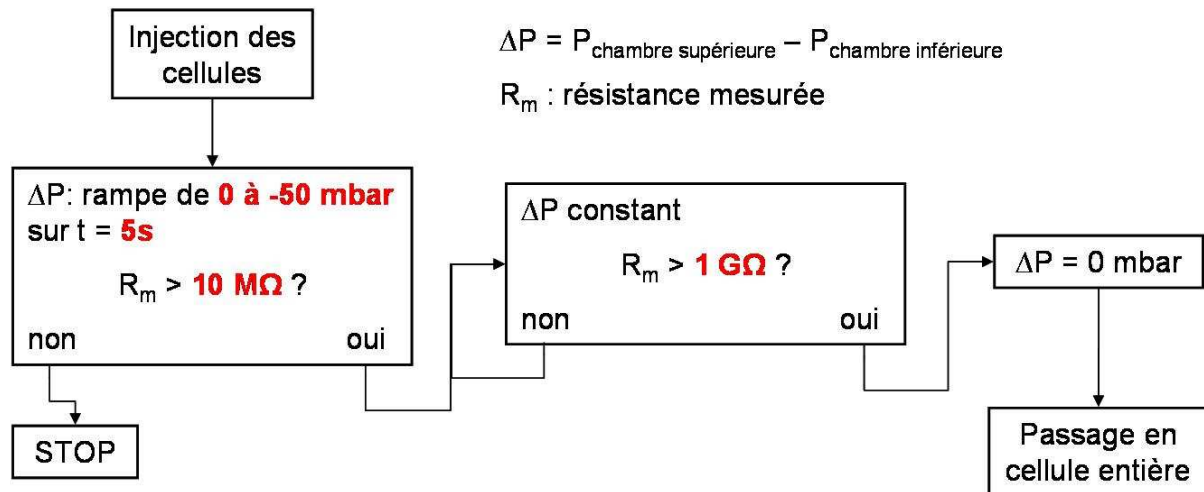


Figure 73 : schéma de principe de la boucle d'asservissement du positionnement de la cellule et de la formation du scellement (en rouge : valeurs seuil fixées par l'utilisateur). Après l'injection des cellules, la différence de pression ΔP diminue progressivement. Dès que la résistance mesurée dépasse la valeur seuil fixée, ΔP est maintenue constante. Si au bout d'un temps t (ici 5s) la valeur seuil n'est pas atteinte, le cycle est stoppé. ΔP constant permet de former le scellement et est maintenu tant que la résistance ne dépasse pas $1 \text{ G}\Omega$ (dans cet exemple). Ensuite, ΔP devient nulle, et l'utilisateur passe à un cycle de passage en cellule entière.

4. Conclusion

Même si les tests électriques n'ont pu être effectués à ce jour, l'automate en cours de développement présente des performances fluidiques intéressantes en terme de faibles volumes et de temps de dispense des fluides. Il devrait permettre de profiter au mieux des performances de la puce en silicium, et de simplifier grandement la procédure actuelle. Nous avons pu remarquer qu'il sera adaptable à tout type d'amplificateur et se placera dans les cages de Faraday commerciales. Il pourra s'avérer d'une grande utilité pour les laboratoires et petites entreprises désireux d'augmenter le rendement de leurs tests, puisque nous prévoyons que le cycle de neuf tests successifs sur une puce en silicium dure 1h30 environ. Enfin, dépourvu d'une électronique de mesure spécifique et adaptable à un poste de patch-clamp conventionnel, le prix de cet automate sera nettement inférieur à celui des automates commercialisés, inabordable pour de petites structures publiques ou privées.

B. Perspectives de valorisation

1. Introduction

Durant ma thèse, plusieurs projets du laboratoire dont le principe est basé sur la mesure de courants ioniques, ont vu le jour et se sont appuyés sur le système Multi-Patch et la puce silicium que j'ai développés.

Deux nouveaux projets d'électrophysiologie planaire sont à ce jour en phase de validation. Le premier est basé sur le développement d'un automate pour paralléliser les mesures de courants ioniques sur des ovocytes de Xénope. Le second projet a pour but d'intégrer sur la puce patch-clamp en silicium des fonctions actives, et de développer un automate associé qui permette d'étudier des cellules transfectées transitoirement.

Un troisième projet vise à s'affranchir de la cellule et à enregistrer des courants ioniques à travers des canaux insérés sur une bicouche lipidique. Enfin, un quatrième projet utilise les microtrous de la puce silicium pour le comptage de particules, présentes dans des échantillons biologiques.

2. Patch ovocytes

2.1. Intérêt des ovocytes en patch-clamp

De nombreuses cellules sont utilisées en tant que support d'expression de gènes codant pour des canaux ioniques. Parmi elles, les ovocytes de Xénope sont fréquemment employés. En effet, les ovocytes sont un système d'expression robuste, de grande taille (entre 0,8 et 1,2 μm de diamètre) qui sont prélevés chirurgicalement chez le Xénope sans entraîner sa mort [35]. Afin de mesurer les courants d'un type de canal ionique donné, l'expérimentateur injecte à l'aide d'une micropipette des ARNm, codant pour le canal, dans le cytosol de la cellule. Après une incubation de 1 à 5 jours les canaux exprimés sur la membrane peuvent être étudiés. Cette étape relativement aisée permet d'obtenir un support de travail en moins d'une semaine, à moindre coût, ce qui a fait de l'ovocyte un hôte de choix en patch-clamp. La taille importante de cette cellule impose l'étude des courants en configuration cellule entière par la technique des doubles électrodes intracellulaires (l'œuf est transpercé par deux pipettes de verre, l'une imposant le potentiel, l'autre mesurant les courants ioniques).

Le développement d'un automate dédié à l'étude des ovocytes permettrait d'augmenter le rendement des tests sur ce modèle cellulaire. A ce jour, il n'existe qu'un seul automate conçu par la société Axon, qui permet de réaliser en parallèle sur huit ovocytes, des mesures en doubles électrodes intracellulaires. Néanmoins, à l'heure actuelle aucun système automatisé n'est basé sur le principe de mesure de courants ioniques en patch-clamp planaire. En 2002, Klemic *et al* ont démontré, sur une puce en PDMS, que l'enregistrement des courants ioniques sur ovocytes en mode cellule attachée était réalisable [77]. La configuration cellule attachée nécessite un système suffisamment sensible pour détecter un faible nombre de canaux. Forts de notre expérience depuis 2002, nous projetons de transposer le format existant pour les cellules de mammifère à un nouveau format planaire dédié à l'étude des ovocytes. Ce nouveau biocapteur permettra de détecter des molécules ciblant des canaux exprimés dans l'ovocyte.

2.2. Objectifs du projet

Le but de ce projet est de créer un dispositif qui permette non seulement de détecter la présence d'agents neurotoxiques dans un échantillon biologique, mais aussi de cribler des molécules pouvant moduler cette reconnaissance. Afin de mieux cerner la réalité physiologique de la cellule, les tests seront réalisés sur des récepteurs et canaux issus de membranes natives, et donc présents dans leur environnement lipidique naturel, et non, comme il est usuel, sur des canaux surexprimés transitoirement par microinjection d'ARNm. Pour ce faire, la technique de microtransplantation de membranes natives dans un ovocyte de Xénope sera mise en œuvre avec des membranes cellulaires provenant de lignées neuronales ou de prélèvements de cerveau humain. La technique de microtransplantation développée par le groupe de R. Miledi [132, 133] permet de reconstituer *in vitro* la diversité naturelle des récepteurs et canaux ioniques endogènes, et ainsi de reproduire et quantifier la réponse électrophysiologique de membranes natives.

La transposition technologique du dispositif actuel Multi-Patch à la configuration « ovocyte » nécessite les étapes de développement suivantes :

- L'ovocyte est entouré d'une membrane de protection, la membrane vitelline, qu'il est nécessaire de retirer afin d'accéder avec la micropipette ou le microtrou à la surface de la membrane cellulaire. Classiquement, l'œuf est plongé dans une solution hypertonique qui fait « gonfler » cette membrane, et sous un microscope, l'expérimentateur peut retirer la membrane à l'aide de pinces très fines. Cette étape très délicate et lente, appelée pelage, ne peut pas être envisagée pour un grand nombre d'ovocytes destinés à être étudiés dans un automate. Au laboratoire, une méthode de pelage enzymatique de cette membrane a été mise au point en parallèle d'une autre équipe [134]. Des tests préliminaires, effectués en patch-clamp conventionnel, ont montré que la formation de scellements résistifs était possible après ce type de pelage et que la digestion n'affectait pas à priori la fonctionnalité de certains canaux. Nous avons donc initié une phase de conception et de fabrication d'une carte fluide planaire pour le « pelage » enzymatique de la membrane vitelline des ovocytes de manière parallèle et automatisée¹².
- Le design de puces en silicium doit être ajusté au format des ovocytes, notamment les caractéristiques des microtrous adaptés aux enregistrements de courants en configuration cellule attachée.
- Enfin, l'automate sera adapté au format des ovocytes. Il sera nécessaire de repenser entièrement l'étage supérieur de mesure afin qu'il soit compatible avec la grande taille de ces cellules et avec l'intégration de la carte de pelage enzymatique.

3. Puce Multi-Patch à haute valeur ajoutée

3.1. Un automate dédié au criblage pharmacologique sur cellules transfectées transitoirement

Dans la course aux nouvelles technologies, à laquelle on assiste à l'heure actuelle, les outils proposés ne présentent pas un niveau d'intégration suffisant en termes de microfluidique et de microélectronique ce qui limite les performances des analyses et le rendement des tests. Au dire des utilisateurs finals, ces systèmes ne disposent pas de système fluide adapté à la

¹² Stage Quentin Josso, 2^{ème} année INPG, juin-sept 06.

manipulation de volumes suffisamment petits de drogues, réactifs ou autres molécules précieuses. Qui plus est, certains systèmes commercialisés ne permettent pas la synchronisation entre dispense des drogues et mesure électrique, ce qui restreint les analyses aux canaux ioniques voltage-dépendants.

Les utilisateurs finals des équipements existants commencent à communiquer sur leur retour d'expérience et expriment volontiers les limites apparentes et les améliorations attendues. Dans le cadre d'un projet européen qui a débuté au cours de l'année 2006, l'objectif est d'utiliser les puces en silicium dans un nouveau dispositif qui permette: la réduction de la consommation en cellules et en drogues et l'analyse des cellules transfectées transitoirement (cf chapitre 1) ce qui éviterait pour chaque type de canal étudié, la production longue et laborieuse de lignées recombinantes stables.

Un tel système représente pour l'industrie pharmaceutique un gain de temps et une réduction des coûts. Pour répondre à ces besoins, deux innovations seront mises en place :

- une gestion des fluides, non pas par canaux, mais par gouttes déplacées par électromouillage,
- un tri de cellules fluorescentes (transfectées) d'intérêts, en amont de la puce.

3.2. Une puce en silicium « multi-fonctions »

Le système de tri cellulaire sera mis en place en s'appuyant sur les compétences d'un partenaire industriel. Un appareil de cette société permet de trier des cellules transfectées transitoirement par cytométrie de flux et détection de fluorescence [5, 18].

Pour la question de la microfluidique, le LETI maîtrise une technologie de déplacement de goutte par électromouillage (système EWOD, ElectroWetting On Dielectric [135]) qui s'avère être une solution performante pour la parallélisation de la microfluidique et la dispense de très faibles volumes. En effet, dans le domaine des laboratoires sur puce, la gestion parallèle des fluides représente souvent un goulet d'étranglement et devient vite le facteur limitant lorsque l'on augmente le nombre de mesures. L'exemple de notre automate en cours de développement (partie A, chapitre 5) en est la preuve puisque la solution actuelle sur l'automate Multi-Patch ne peut pas être envisagée pour paralléliser une centaine de mesures par exemple. Le principe EWOD sera donc implanté sur une puce en silicium comportant des microtrous avec les caractéristiques que j'ai définies dans le chapitre 3. A partir de réservoirs contenant quelques centaines de μL de solution, des gouttes de 64 nL sont formées et déplacées grâce à un réseau d'électrodes vers les sites de mesures [136, 137]. Ce système sera également capable de réaliser des dilutions *in situ* à partir d'une solution mère déposée dans un de ses réservoirs. L'ajout de la fonction EWOD sur les puces en silicium permettra de répondre aux besoins de faible consommation de volume des échantillons et d'alimenter de manière indépendante un grand nombre de sites de mesure (~ 100) avec un nombre d'entrées fluidiques faible (~ 5), égal au nombre de solutions à utiliser durant l'expérience.

4. Applications parallèles

4.1. Membrane lipidique sur puce en silicium

Les bicouches lipidiques artificielles peuvent également servir de support à l'étude des canaux ioniques, puisqu'il est possible d'enrichir des bicouches par des molécules formant des pores, comme la gramicidine, qui s'insèrent par simple diffusion ou encore des protéines canal. La technique du potentiel imposé à une bicouche lipidique est aujourd'hui utilisée à chaque fois que la technique du patch-clamp ne peut être mise en œuvre, lorsque les cellules sont de trop petite taille, ou lorsque les canaux sont présents dans des organelles cytoplasmiques de petite taille (mitochondries par exemple). Cette technique est également utilisée lorsqu'on ne désire étudier qu'un seul canal, en diminuant la concentration de la protéine jusqu'à la protéine unique [138]. Enfin, l'apparition des biopuces permet d'envisager l'utilisation de bicouche bilipidique sur puce pour des applications biocapteurs, par exemple, ou encore pour développer des instruments haut débit afin de caractériser des canaux ioniques dans des bicouches.

La méthode la plus couramment utilisée consiste à séparer deux compartiments de quelques mL par une feuille de Téflon percée d'un orifice de 50 μm à 2 mm. Cet orifice est recouvert par une bicouche lipidique puis les protéines à étudier sont ajoutées dans un compartiment et s'insèrent dans la bicouche [139]. Afin d'augmenter la stabilité des bicouches et de concevoir des systèmes de mesure plus sensibles, plusieurs équipes travaillent sur le concept de bicouche lipidique sur puce. Ceci implique entre autres d'adapter les protocoles de dépôts de bicouche lipidique grâce à des systèmes microfluidiques au format des laboratoires sur puce. De nombreux travaux font état d'enregistrements de courants ioniques sur bicouche lipidique déposée sur du borosilicate [107], du Téflon [140], ou encore du silicium [141, 142]. Au sein du laboratoire, une équipe développe une puce dédiée à cette application et utilise le système d'assemblage Multi-Patch ainsi que la technologie des puces silicium que nous avons développée pendant mes travaux de thèse [143].

4.2. Comptage de particules

La dernière application utilisant le système Multi-Patch concerne la détection et le comptage de particules à travers des micro et nanopores. La détection de particules dans les échantillons médicaux est actuellement réalisée à l'aide de méthodes lentes et fastidieuses comme la microscopie optique ou la microscopie électronique à balayage. Une équipe du laboratoire propose d'utiliser une méthode plus simple et plus rapide pour détecter des particules de tailles micrométriques et sub-micrométriques : la détection électrique du passage de particules à travers des microtrous dans une puce en silicium.

Cette technique de détection électrique est basée sur le principe du compteur de Coulter permettant de déterminer la concentration et la taille des particules dans une solution : une particule passant à travers un orifice sub-millimétrique, ou un capillaire, rempli par une solution conductrice génère une variation transitoire du courant mesuré à l'aide d'une électronique sensible [144]. La taille de la particule peut être mesurée à partir de l'amplitude du pic de courant qu'elle génère. De plus, le nombre de pics de courant par unité de temps permet de remonter à la concentration des particules dans l'échantillon. La possibilité de compter électriquement des cellules [144], des bactéries [145], des virus [146] ou des particules de polystyrène [147] a été démontrée depuis plusieurs années, et l'équipe du laboratoire envisage d'adapter cette technique à l'analyse de particules dans des échantillons

biologiques comme le sang de patients. Dans la phase de validation, nous avons utilisé le système Multi-Patch ainsi que des puces en silicium identiques à celles décrites dans ce manuscrit mais possédant des trous de 3,7 μm de diamètre.

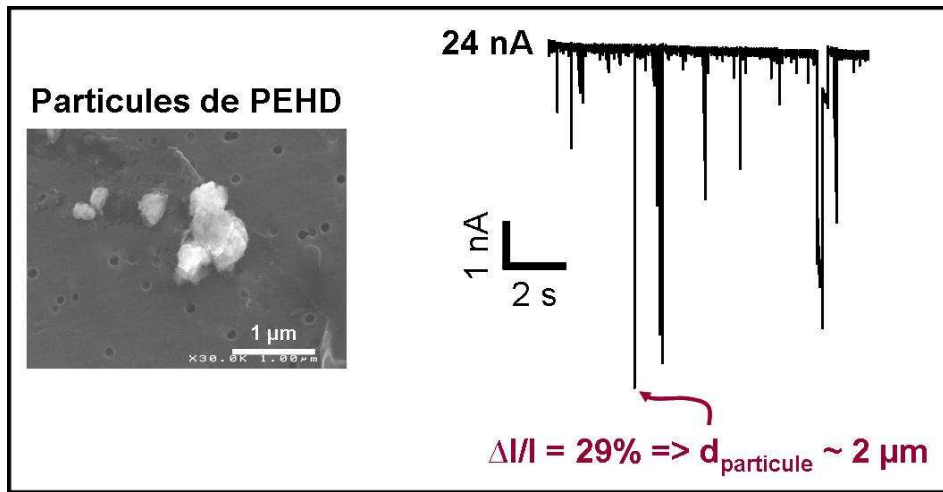


Figure 74 : détection électrique du passage de particules de PEHD (Polyéthylène Haute Densité) à travers un pore de 3,7 μm de diamètre. *A gauche* : photo MEB de particules de PEHD déposées sur un filtre en polycarbonate comportant des pores de 100 nm de diamètre (un dépôt de 20 Å de platine a été réalisé sur l'échantillon avant l'observation MEB). *A droite* : courant mesuré à travers le pore lors du passage de plusieurs particules. ΔI est l'amplitude du pic de courant, I est le courant de la ligne de base, ici 24 nA. En prenant en compte la résistivité de la solution tampon utilisé (0,83 $\Omega\cdot\text{m}$), le diamètre et la hauteur du microtrou, on peut estimer le diamètre de la particule qui a généré le pic de courant.

Les premières expériences ont été menées pour détecter le passage de particules de polyéthylène (Figure 74). L'échantillon contenant les particules de polyéthylène dans une solution conductrice (PBS) est déposé dans la chambre supérieure du système. Une aspiration constante permet alors de faire circuler les particules à travers le microtrou de la puce en silicium. Comme on le voit sur la Figure 74, les microparticules de polyéthylène sont détectées individuellement, et l'amplitude des pics de courant générés par chaque particule donne une information sur leur taille. Il est donc possible ensuite d'analyser la distribution de la taille des particules dans l'échantillon analysé.

Conclusion

1. L'évolution des performances du système Multi-Patch en chiffres

Durant les trois années de thèse, le dispositif Multi-Patch a fortement évolué, tant dans ses performances que dans sa conception. Cette évolution est retracée en quelques chiffres dans le Tableau 15 ci-dessous.

Mon travail a débuté par la réalisation d'un système permettant de mettre en œuvre la puce en silicium, c'est-à-dire présentant des connexions électriques de part et d'autre de la puce et des connexions fluidiques pour dispenser les différentes solutions électrophysiologiques. Les premières puces en silicium conçues ont permis d'obtenir 23 % de scellements exploitables pour des mesures de courants ioniques en cellule entière (c'est-à-dire avec des résistances de scellement supérieure à 100 MΩ) et 4 % de « gigaseals ». Ces résultats, suffisants pour obtenir une preuve de faisabilité en enregistrant des courants ioniques de canaux voltage-dépendants de forte conductance, ont aussi révélé les points à améliorer afin de disposer d'un système plus performant : améliorer l'interaction de la cellule sur le microtrou et réduire la capacité de la puce silicium.

	Démonstrateur première génération		Automate pré-industriel
	Puces initiales	Puces après plan d'expériences	Puces « optimales » (prévisions)
% des scellements exploitables (> 100 MΩ)	23	80	≥ 80
% de « gigaseals »	4	55	≥ 55
Stabilité du scellement	faible	> 20 minutes	> 20 minutes
Capacité	~ 250 pF	~ 25 pF	< 20 pF
Mesures électrophysiologiques	Canaux voltage-dépendants à forte conductance unitaire	Tout type de canaux voltage-dépendants Courbes dose-réponse Normalisation des courants	Canaux voltage-dépendants et chemo-sensibles
Temps d'assemblage	20 min	20 min	5 min
Temps de manipulation (9 sites)	2 – 3 h	2 – 3 h	1 – 1h30

Tableau 15 : évolution des performances du système Multi-Patch. Le temps de manipulation sur les 9 sites de mesure comprend : l'assemblage, la dispense des cellules, la formation du scellement, la mesure des courants (étape dont la durée varie suivant le protocole pharmacologique utilisé).

L'interaction cellule/microtrou a constitué le cœur de mon travail. Afin que la puce offre un rendement de « gigaseals » au moins égal à celui du patch-clamp conventionnel, j'ai optimisé d'une part la qualité de la suspension cellulaire et d'autre part les caractéristiques des puces. Un mode de préparation et de conservation des cellules optimal a ainsi été mis au point. En parallèle, j'ai mené une étude systématique de l'influence des différents paramètres de la puce sur la qualité du scellement de la cellule en m'appuyant sur un plan d'expériences. Cette étude a permis de concevoir une puce performante, dont les rendements de scellements, permettant

Conclusion

de réaliser des mesures en cellule entière, sont de l'ordre de 80% et dont le taux de « gigaseals » est de 55%.

Je me suis également concentré sur l'inconvénient majeur des puces en Silicium, leur forte capacité intrinsèque. En diminuant la surface de fluide en contact avec la puce et en augmentant l'épaisseur des couches d'isolants, j'ai réduit la capacité des puces d'un facteur 10 (de 250 à 25 pF). Elles sont donc moins sensibles aux perturbations du 50Hz, génèrent moins de bruit électronique et permettent de mesurer plus précisément les capacités des cellules scellées sur les microtrous.

Lors de la phase de validation, plusieurs enregistrements ont été réalisés sur des canaux voltage-dépendants (IRK1, hERG ou encore BK(Ca) exprimés de manière inductible) : courbes dose réponse, détermination de concentration IC50, normalisation de courants...ont mis en évidence la robustesse, la fiabilité et la sensibilité du système.

Le système que j'ai développé a permis de rattraper voire de dépasser l'état de l'art existant en terme de performances de la puce, puisqu'actuellement, aucun système basé sur l'utilisation d'une puce en silicium ne combine faible capacité et rendement important de « gigaseals ». De plus, le développement d'un automate de laboratoire pré-industriel permet d'envisager encore l'accroissement des performances :

- réduction des capacités grâce à l'utilisation de canaux de microfluidique,
- augmentation des rendements de gigaseals en mettant au point un protocole automatique donc plus reproductible,
- simplification de la mise en œuvre et réduction des temps de manipulation.

2. Mise en place d'une méthode systématique

Au-delà de l'optimisation du système, j'ai abordé un sujet non étudié de façon systématique jusqu'à présent : la formation du « gigaseal » et l'interaction de la cellule avec le microtrou. J'ai en effet tenté de déterminer l'influence des différents paramètres de la puce sur la formation du scellement: diamètre, hauteur, et forme du microtrou, rugosité et énergie de la surface. Pour ce faire, j'ai basé mon étude sur un plan d'expériences, la modélisation de la forme du microtrou et des caractérisations physico-chimiques de surface: observations MEB, mesures AFM, XPS et mesures d'énergies de surface par la méthode d'angle de contact. Les résultats de cette étude sont de deux types: ceux dont l'application est immédiate et ceux qui s'inscrivent dans une démarche plus fondamentale de compréhension des mécanismes de la formation du scellement.

Parmi les paramètres étudiés j'ai donc tout d'abord mis en évidence l'importance des hautes énergies de surface et des faibles diamètres de microtrou devant la rugosité et la hauteur du microtrou. La conception de la puce « optimale » en cours de fabrication s'est d'ailleurs appuyée sur ces résultats.

Ensuite, lors de ces travaux j'ai confirmé une des hypothèses émises par Corey et Stevens en 1984 sur les interactions mises en jeu lors du « gigaseal », en montrant que les interactions polaires sont réellement impliquées dans la formation du scellement. L'utilisation des substrats plans en patch-clamp offre la possibilité de mieux comprendre les mécanismes, encore mal connus, mis en jeu lors de la formation du scellement. En effet, contrairement aux micropipettes de verre, ils peuvent faire l'objet de nombreuses caractérisations et des tests complémentaires pourraient apporter des informations fondamentales importantes sur ce phénomène de « gigaseal ».

3. Travailler dans un environnement pluridisciplinaire

Mon travail au sein du laboratoire Biopuces ne s'est pas arrêté au seul développement du démonstrateur Multi-Patch, puisque j'ai mené des actions ponctuelles et parallèles en m'impliquant dans d'autres projets du laboratoire, s'intéressant à la mesure des courants faibles. Les résultats prometteurs obtenus sur les puces en silicium ont abouti à la création de deux projets d'électrophysiologie planaire : développement d'un automate pour des applications de mesures de courants ioniques sur ovocytes de Xénope et conception d'un système, unique à ce jour, permettant d'étudier des cellules transfectées transitoirement. Ces projets, engagés sur 2005-2009, illustrent la montée en puissance du projet Multi-Patch à partir des briques de base validées pendant ma thèse.

Par ailleurs, l'aspect modulaire de notre assemblage a permis, en ne modifiant que la puce en silicium, de mettre à profit le système Multi-Patch dans des mesures de courant à travers des bicouches lipidiques ou encore dans la détection et le comptage de particules au travers un microtrou (selon le principe du compteur de Coulter). Ces projets parallèles m'ont permis d'aider les acteurs à adapter l'instrumentation à d'autres applications et de valoriser ainsi mes travaux autour de la plateforme Multi-Patch devenue un outil générique au laboratoire.

J'aimerais conclure ce bilan de trois ans de travaux en évoquant l'effervescence scientifique qui règne au laboratoire Biopuces et dans son environnement. Le laboratoire Biopuces héberge de nombreux projets aux objectifs très différents, mais tous présentent le point commun de faire appel à diverses disciplines : biologie, chimie, physique et informatique. J'ai ainsi pu interagir avec de nombreux collègues et partenaires du laboratoire et du LETI, mais également avec des industriels. Les échanges fructueux d'idées et de techniques qui en sont ressortis ont largement participé à la réussite de ce projet. Enfin, cette thèse a été pour moi l'occasion d'encadrer des stagiaires venus renforcer l'équipe « Multi-Patch » et dont les travaux ont beaucoup aidé à l'évolution du projet.

Références

1. Bodovitz, S., T. Joos, and J. Bachmann, *Protein biochips: the calm before the storm*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(4): p. 283-287.
2. Bashir, R., *BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(11): p. 1565-86.
3. Yi, C., et al., *Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells*. Analytica Chimica Acta, 2006. **560**(1): p. 1-23.
4. Cheung, K.C. and P. Renaud, *BioMEMS for medicine: On-chip cell characterization and implantable microelectrodes*. Solid State Electronics, 2006. **50**(4): p. 551-557.
5. Andersson, H. and A. van den Berg, *Microfluidic devices for cellomics: a review*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2003. **92**(3): p. 315-325.
6. El-Ali, J., P.K. Sorger, and K.F. Jensen, *Cells on chips*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 403-411.
7. Geschke, O., H. Klank, and P. Tellemann, *Microsystem engineering of lab-on-a-chip devices*, ed. Wiley-VCH. 2004.
8. Campas, M. and I. Katakis, *DNA biochip arraying, detection and amplification strategies*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(1): p. 49-62.
9. Wick, I. and G. Hardiman, *Biochip platforms as functional genomics tools for drug discovery*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2005. **8**(3): p. 347-54.
10. Chen, D.S. and M.M. Davis, *Molecular and functional analysis using live cell microarrays*. Current Opinion in Chemical Biology, 2006. **10**(1): p. 28-34.
11. Castel, D., et al., *Cell microarrays in drug discovery*. Drug Discovery Today, 2006. **11**(13): p. 616-622.
12. Voldman, J., *Engineered systems for the physical manipulation of single cells*. Curr Opin Biotechnol, 2006.
13. Schaack B, R.J., Combe S, Fouqué B, Berger F, Boccard S, Filhol-Cochet O, Chatelain F, *A drop-chip cell array for high throughput DNA and siRNA transfection combined with drug screening*. Nanobiotechnology, 2005. **10**.
14. Reininger-Mack, A., H. Thielecke, and A.A. Robitzki, *3D-biohybrid systems: applications in drug screening*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**(2): p. 56-61.
15. Morin, F.O., Y. Takamura, and E. Tamiya, *Investigating neuronal activity with planar microelectrode arrays: achievements and new perspectives*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005. **100**(2): p. 131-143.
16. Fromherz, P., *Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells and Brain*. In: Nanoelectronics and information technology, ed. W.-V. Rainer Waser. 2003.
17. Le Pioufle, B., et al., *Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection*. Materials Science and Engineering: C, 2000. **12**(1): p. 77-81.
18. Muller, T., et al., *A 3-D microelectrode system for handling and caging single cells and particles*. Biosensors and Bioelectronics, 1999. **14**(3): p. 247-256.
19. Fuchs, A.B., et al., *Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples*. Lab Chip, 2006. **6**: p. 121-126.
20. Chiou, P.Y., A.T. Ohta, and M.C. Wu, *Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images*. Nature, 2005. **436**(7049): p. 370-372.
21. Lee, H., A.M. Purdon, and R.M. Westervelt, *Manipulation of biological cells using a microelectromagnet matrix*. Applied Physics Letters, 2004. **85**(6): p. 1063-1065.
22. Han, K. and A.B. Frazier, *Continuous magnetophoretic separation of blood cells in microdevice format*. Journal of Applied Physics, 2004. **96**(10): p. 5797-5802.
23. Ozkan, M., et al., *Optical Manipulation of Objects and Biological Cells in Microfluidic Devices*. Biomedical devices, 2003. **5**(1): p. 61-67.

24. Enger, J., et al., *Optical tweezers applied to a microfluidic system*. Lab Chip, 2004. **4**: p. 196.
25. Wheeler, A.R., et al., *Microfluidic device for single-cell analysis*. Anal Chem, 2003. **75**(14): p. 3581-3586.
26. Taketani, M. and M. Baudry, *Advances in Network Electrophysiology Using Multi-Electrode Arrays*, ed. Springer. 2006.
27. Schoen, I. and P. Fromherz, *Activation of Na channels in cell membrane by capacitive stimulation with silicon chip*. Applied Physics Letters, 2005.
28. Punske, B.B., et al., *Effect of fiber orientation on propagation: electrical mapping of genetically altered mouse hearts*. Journal of Electrocardiology, 2005. **38**(4): p. 40-44.
29. Stoppini, L., et al., *Sprouting and functional recovery in co-cultures between old and young hippocampal organotypic slices*. Neuroscience, 1997. **80**(4): p. 1127-1136.
30. Fromherz, P., *Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain*. Physica E, 2003. **16**(1): p. 24-34.
31. Jenkner, M., B. Müller, and P. Fromherz, *Interfacing a silicon chip to pairs of snail neurons connected by electrical synapses*. Biol Cybern, 2001. **84**(4): p. 239-249.
32. Stett, A., et al., *Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 486-95.
33. Comley, J., *patchers V screeners : divergent opinion on high throughput electrophysiology*. drug discovery world fall, 2003.
34. Rawn, J.D., *Traité de Biochimie*: Ed. Universitaires.
35. Joffre, M., *Electrophysiologie moléculaire I*. Editeurs des sciences et des arts ed, ed. c.e.d. sciences. Vol. 1. 2001, Paris: Hermann. 163.
36. Dubois, J.M., *Les canaux ioniques cellulaires*. Economica ed. 1999.
37. Wang, X. and M. Li, *Automated electrophysiology: high throughput of art*. Assay Drug Dev Technol, 2003. **1**(5): p. 695-708.
38. Sakmann, B. and E. Neher, *Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes*. Annu Rev Physiol, 1984. **46**: p. 455-72.
39. Joffre, M., *Electrophysiologie moléculaire II*. Editeurs des sciences et des arts ed, ed. c.e.d. sciences. Vol. 2. 2001, Paris: Hermann. 296.
40. Xu, J., Y. Chen, and M. Li, *High-throughput technologies for studying potassium channels-progresses and challenges*. drug discovery today, 2004. **3**(1): p. 32-38.
41. Catacuzzeno, L., et al., *Characterization of the large-conductance Ca-activated K channel in myocytes of rat saphenous artery*. Pflugers Arch, 2000. **441**(2-3): p. 208-218.
42. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-1351.
43. Nilius, B. and G. Droogmans, *Ion channels and their functional role in vascular endothelium*. Physiol Rev, 2001. **81**(4): p. 1415-59.
44. Curran, M.E., *Potassium ion channels and human disease: phenotypes to drug targets?* Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(6): p. 565-72.
45. Sanguinetti, M.C., et al., *A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel*. Cell, 1995. **81**(2): p. 299-307.
46. Xu, J., et al., *Ion-channel assay technologies: quo vadis?* Drug Discovery Today, 2001. **6**(24): p. 1278-1287.
47. Owen, D. and A. Silverthorne, *Channeling drug discovery, current trends in ion channel discovery research*. drug discovery world, 2002. **3**: p. 48-61.
48. Terstappen, G.C., *Ion channel screening technologies today*. Drug Discovery Today: Technologies, 2005. **2**(2): p. 133-140.

49. Picollet D'Hahan, N., *Chapitre 11: Canaux ioniques et patch-clamp. Dans: NanoBiotechnologies*, ed. Belin. parution fin 2006.
50. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
51. Lindau, M. and E. Neher, *Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells*. Pflugers Arch, 1988. **411**(2): p. 137-146.
52. Rae, J.L. and R.A. Levis, *Glass technology for patch clamp electrodes*. Methods Enzymol, 1992. **207**: p. 66-92.
53. Sakmann, B. and E. Neher, *Geometric parameters of pipettes and membrane patches. In: Single-Channel Recording. Second Edition*. Eds. Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Publishing Corp., New York., 1995: p. pp 637-650.
54. Axon-Instruments, *The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques*. 1993.
55. Penner, R., *A practical guide to patch-clamping. In: Single-Channel Recording. Second Edition*. Eds. Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Publishing Corp., New York., 1995: p. p 3-28.
56. Sigworth, F.J., *Electronic Design of the Patch-clamp. In: Single-Channel Recording. Second Edition*. Eds. Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Publishing Corp., New York., 1995: p. p95-126.
57. Picones, A., E. Keung, and L.C. Timpe, *Unitary conductance variation in Kir2.1 and in cardiac inward rectifier potassium channels*. Biophys J, 2001. **81**(4): p. 2035-2049.
58. SophionBiosciences. <http://www.sophion.dk>.
59. Kass, R.S., *The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 1986-1989.
60. Ascroft, F., *Ion channels and diseases : channelopathies*. 2000, San Diego: Academic press.
61. Sigworth, F.J. and K.G. Klemic, *Microchip technology in ion-channel research*. IEEE Trans Nanobioscience, 2005. **4**(1): p. 121-7.
62. Roden, D.M., *Drug-induced prolongation of the QT interval*. N Engl J Med, 2004. **350**(10): p. 1013-1022.
63. Tao, H., et al., *Cell isolation for high quality electrophysiological measurements on planar electrodes*. 2004.
64. Ouadid-Ahidouch, H., et al., *Kv1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278**(2): p. 272-277.
65. Ouadid-Ahidouch, H., et al., *Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 244-251.
66. Ouadid-Ahidouch, H., et al., *Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(1): p. C125-134.
67. Lin, C.S., et al., *Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation*. J Exp Med, 1993. **177**(3): p. 637-645.
68. Bringmann, A., et al., *Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Muller cells*. Glia, 2000. **29**(1): p. 35-44.
69. Willumsen, N.J., et al., *High throughput electrophysiology: new perspectives for ion channel drug discovery*. Receptors Channels, 2003. **9**(1): p. 3-12.

70. Picollet D'Hahan, N., *Chapitre 20: Pucés patch-clamp. Dans: NanoBiotechnologies*, ed. Belin. parution fin 2006.
71. Sigworth, F.J. and K.G. Klemic, *Patch clamp on a chip*. Biophys J, 2002. **82**(6): p. 2831-2832.
72. Asmild, M., et al., *Upscaling and automation of electrophysiology: toward high throughput screening in ion channel drug discovery*. Receptors Channels, 2003. **9**(1): p. 49-58.
73. Lepple-Wienhues, A., et al., *Flip the tip: an automated, high quality, cost-effective patch clamp screen*. Receptors Channels, 2003. **9**(1): p. 13-7.
74. Pihl, J., M. Karlsson, and D.T. Chiu, *Microfluidic technologies in drug discovery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(20): p. 1377-1383.
75. Pihl, J., et al., *Microfluidics for cell-based assays*. Materials Today, 2005. **8**(12): p. 46-51.
76. Sinclair, J., et al., *Stabilization of high-resistance seals in patch-clamp recordings by laminar flow*. Anal Chem, 2003. **75**(23): p. 6718-22.
77. Klemic, K.G., et al., *Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells*. Biosens Bioelectron, 2002. **17**(6-7): p. 597-604.
78. Fertig, N., R.H. Blick, and J.C. Behrends, *Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip*. Biophys J, 2002. **82**(6): p. 3056-3062.
79. Fertig, N., et al., *Microstructured apertures in planar glass substrates for ion channel research*. Receptors Channels, 2003. **9**(1): p. 29-40.
80. Fertig, N., et al., *Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2001. **64**(4 Pt 1).
81. Kiss, L., et al., *High throughput ion-channel pharmacology: planar-array-based voltage clamp*. Assay Drug Dev Technol, 2003. **1**(1 Pt 2): p. 127-135.
82. Schroeder, K., et al., *Ionworks HT: a new high-throughput electrophysiology measurement platform*. J Biomol Screen, 2003. **8**(1): p. 50-64.
83. Alan, F., et al., *Population patch clamp improves data consistency and success rates in the measurement of ionic currents*. J Biomol Screen, 2006. **11**(5): p. 488-496.
84. PatchXPress. <http://www.moleculardevices.com/pages/instruments/patchxpress.html>.
85. Kutchinsky, J., et al., *Characterization of potassium channel modulators with QPatch automated patch-clamp technology: system characteristics and performance*. Assay Drug Dev Technol, 2003. **1**(5): p. 685-93.
86. Brueggemann, A., et al., *Ion channel drug discovery and research : the automated nano-patch-clamp technology*. current drug discovery, 2004. **1**: p. 91-96.
87. Bruggemann, A., et al., *High quality ion channel analysis on a chip with the NPC technology*. Assay Drug Dev Technol, 2003. **1**(5): p. 665-673.
88. Stett, A., et al., *CYTOCENTERING: a novel technique enabling automated cell-by-cell patch clamping with the CYTOPATCH chip*. Receptors Channels, 2003. **9**(1): p. 59-66.
89. Klemic, K.G., J.F. Klemic, and F.J. Sigworth, *An air-molding technique for fabricating PDMS planar patch-clamp electrodes*. Pflugers Arch, 2005. **449**(6): p. 564-72.
90. Li, X., et al., *Microfluidic system for planar patch clamp electrode arrays*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 815-819.
91. Seo, J., et al., *Integrated multiple patch-clamp array chip via lateral cell trapping junctions*. Applied physics letters, 2004. **84**(11): p. 1973-1975.
92. Ionescu-Zanetti, C., et al., *Mammalian electrophysiology on a microfluidic platform*. Proc Natl Acad Sci, 2005. **102**(9): p. 112-117.

93. Schmidt, C., M. Mayer, and H. Vogel, *A Chip-Based Biosensor for the Functional Analysis of Single Ion Channels*. Angew Chem Int Ed Engl, 2000. **39**(17): p. 3137-3140.
94. Ly, J.Q., G. Shyy, and D.L. Misner, *Assessing hERG Channel Inhibition Using PatchXpress*. Journal of the Association for Laboratory Automation, 2005. **10**(4): p. 225-230.
95. Picollet-D'Hahan, N., et al., *A silicon-based "Multi-Patch" device for ion channel current sensing*. Sensor letters, 2004. **2**(2): p. 91-94.
96. Corey, D.P. and C.F. Stevens, *Science and technology of patch-recording electrodes*. In : *Single-Channel Recording*. Eds. Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Publishing Corp., New York., 1983: p. pp 53-68.
97. Marty, A. and E. Neher, *Tight-seal whole-cell recording*. In: *Single-Channel Recording. Second Edition*. Eds. Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Publishing Corp., New York., 1995: p. p31-51.
98. Sordel, T., et al., *A silicon-based Mutli-Patch device: application for ionic currents sensing on single cells*. Proceedings in Micro Total Analysis Systems, 2004. **1**: p. 521.
99. Pantoja, R., et al., *Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics*. Biosens Bioelectron, 2004. **20**(3): p. 509-17.
100. Sordel, T., et al., *Une nouvelle génération de biocapteur pour accélérer la mesure des courants ioniques cellulaires*. Poster 16^{èmes} Rencontres Régionales de la Recherche en Rhône-Alpes, Alpexpo Grenoble., 2006.
101. Straub, B., E. Meyer, and P. Fromherz, *Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(2): p. 121-4.
102. Busse, R., A. Mülsch, and I. Fleming, *Mechanisms of nitric oxide release from vascular endothelium*. Circulation, 1993. **87**: p. 18-25.
103. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, 1996. **84**(3): p. 345-57.
104. Sordel, T., et al., *Influence of glass and polymer coatings on CHO cell morphology and adhesion*. Biomaterials, in press, 2006.
105. Tank, D.W., C. Miller, and W.W. Webb, *Isolated-patch recording from liposomes containing functionally reconstituted chloride channels from Torpedo electroplax*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7749-7753.
106. Opsahl, L.R. and W.W. Webb, *Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes*. Biophys J, 1994. **66**(1): p. 75-9.
107. Sondermann, M., et al., *High-resolution electrophysiology on a chip: Transient dynamics of alamethicin channel formation*. BBA - Biomembranes, 2006. **1758**(4): p. 545-551.
108. Díaz-Rivera, R.E. and B. Rubinsky, *Electrical and thermal characterization of nanochannels between a cell and a silicon based micro-pore*. Biomed Microdevices, 2006. **8**(1): p. 25-34.
109. Ruknudin, A., M.J. Song, and F. Sachs, *The ultrastructure of patch-clamped membranes: a study using high voltage electron microscopy*. J Cell Biol, 1991. **112**(1): p. 125-134.
110. Mc Dowell, M. and E. Gray, *An optimal cell detection technique for automated patch clamping*. NASA/TM, 2004: p. 1-8.
111. Fowkes, F.M., *Attrative forces at interfaces*. Industrial engineering chemistry, 1964. **56**(12): p. 40-52.
112. Owens, D.K. and R.C. Wendt, *Estimation of the surface free energy of polymers*. Journal of Applied Polymer Science, 1969. **13**(8): p. 1741-1747.

113. Dupré, A., *Théorie mécanique de la chaleur*, ed. Gauthier-Villars. 1869, Paris.
114. Good, R.J. and L.A. Girifalco, *A theory for estimation of surface and interfacial energies.III. Estimation of surface energies of solids from contact angle data*. Journal of Physical Chemistry, 1960. **64**(5): p. 561-565.
115. Sordel, T., et al., *Plasma O₂ treatment on SiO₂ coating improves the cell/surface interactions for patch-clamp measurements on chip*. Poster NanoBio Europe 06, Minatec Grenoble, 2006.
116. MolecularDevices. <http://www.moleculardevices.com>.
117. Matthews, B. and J.W. Judy, *Characterization of a micromachined planar patch-clamp for cellular electrophysiology*. IEEE-EMBS International Conference on Neural Engineering, 2003: p. 648-651.
118. Benndorf, K., *Low-noise recording*. In: *Single-Channel Recording. Second Edition*. Eds. Bert Sakmann and Erwin Neher. Plenum Publishing Corp., New York., 1995: p. p129-145.
119. Sordel, T., et al., *Hourglass SiO₂ coating increases the performance of planar patch-clamp*. Journal of Biotechnology, 2006. **125**(1): p. 142-154.
120. Peterman, M.C., et al., *Ion Channels and Lipid Bilayer Membranes Under High Potentials Using Microfabricated Apertures*. Biomedical Microdevices, 2003. **4**(3): p. 231-236.
121. Kim, S.J., et al., *Inwardly rectifying K⁺ channels in the basolateral membrane of rat pancreatic acini*. Pflugers Arch, 2000. **441**(2): p. 331-340.
122. <http://www.erudit.org>.
123. Sanguinetti, M.C. and M. Tristani-Firouzi, *hERG potassium channels and cardiac arrhythmia*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 463-469.
124. Wang, J., et al., *Functional and pharmacological properties of canine ERG potassium channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H256-H267.
125. Nanion, <http://www.nanion.de>.
126. Trapani, J.G. and S.J. Korn, *Control of ion channel expression for patch clamp recordings using an inducible expression system in mammalian cell lines*. BMC Neurosci, 2003. **4**(1): p. 15.
127. Polk, B.J., et al., *Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics*. Sensors & Actuators: B. Chemical, 2006. **114**(1): p. 239-247.
128. Tabling, P., *Introduction à la microfluidique*. 2003: Belin.
129. Minteer, S.D., *Microfluidic Techniques. Reviews and protocols*. 2006: Humana Press
130. Berdichevsky, Y., et al., *UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2004. **97**(2): p. 402-408.
131. Young Shik, S., et al., *PDMS-based micro PCR chip with Parylene coating*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2003. **13**(5): p. 768-774.
132. Palma, E., et al., *Microtransplantation of membranes from cultured cells to Xenopus oocytes: A method to study neurotransmitter receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003.
133. Miledi, R., et al., *Expression of functional neurotransmitter receptors in Xenopus oocytes after injection of human brain membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**: p. 13238-13242.
134. Wang, M.H., *A technical consideration concerning the removal of oocyte vitelline membranes for patch clamp recording*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(3): p. 971-972.
135. Mugele, F. and J. Baret, *Electrowetting: from basics to applications*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2005. **17**(28): p. 705-774.

136. Berthier, J., et al., *Computer aided design of an EWOD microdevice*. Sensors & Actuators: A. Physical, 2006. **127**(2): p. 283-294.
137. Fouillet, Y., et al., *Design and validation of a complex generic fluidic microprocessor based on ewod droplet for biological applications*. Proceedings of μ TAS 2005 conference, 2005. **1**: p. 58.
138. Bacri, L., et al., *Ionic channel behavior of modified cyclodextrins inserted in lipid membranes*. Langmuir, 2005. **21**(13): p. 5842-5846.
139. Tien, H.T. and A. Ottava-Leitmannova, *Planar lipid bilayers (BLMs) and their application*. Ed 2003: Elsevier.
140. Mayer, M., et al., *Microfabricated teflon membranes for low-noise recordings of ion channels in planar lipid bilayers*. Biophys J, 2003. **85**(4): p. 2684-2695.
141. Urisu, T., et al., *Formation of high-resistance supported lipid bilayer on the surface of a silicon substrate with microelectrodes*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2005. **1**(4): p. 317-322.
142. Pantoja, R., et al., *Bilayer reconstitution of voltage-dependent ion channels using a microfabricated silicon chip*. Biophys J, 2001. **81**(4): p. 2389-2394.
143. Simon, A., et al., *Formation and stability of a suspended lipid bilayer on silicon submicron size pores*. Soumis à Sensors and Actuators, 2006.
144. Coulter, W.H., *Means for counting particles suspended in a fluid*. US patent No. 2656508, Oct. 20, 1953.
145. Kubitschek, H.E., *Electronic counting and sizing of bacteria*. Nature, 1958. **182**(4630): p. p234-235.
146. DeBlois, R.W., C.P. Bean, and R.K.A. Wesley, *Electrokinetic measurements with submicron particles and pores by the resistive pulse technique*. Journal of Colloid and Interface Science, 1977. **61**(2): p. 323-335.
147. DeBlois, R.W. and C.P. Bean, *Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique*. Rev. Sci. Instr, 1970. **41**(7): p. 909-916.

Annexes

Annexes

Annexe 1: Théorie des plans d'expériences.

L'étude d'un phénomène peut, le plus souvent, être schématisée de la manière suivante : on s'intéresse à une grandeur, Y que nous appellerons « réponse » qui dépend d'un grand nombre de variables, X_1, X_2, \dots, X_n , que nous appellerons « facteurs ».

La modélisation mathématique consiste à trouver une fonction f telle que $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$. Une méthode classique d'étude consiste en la mesure de la réponse Y pour plusieurs valeurs de la variable X_i tout en laissant fixe la valeur des $(n - 1)$ autres variables. On itère alors cette méthode pour chacune des variables. Ainsi, dans le cas de notre étude par exemple, si nous avons 5 paramètres et si l'on décide de donner 4 valeurs expérimentales à chacun d'eux, nous sommes conduit à effectuer $4^5 = 1024$ expériences, soit 1024 types de puces à fabriquer. Ce nombre élevé dépasse les limites de faisabilité tant en temps qu'en coût. Il faut donc réduire le nombre d'expériences à effectuer sans pour autant perdre sur la qualité des résultats recherchés. L'utilisation d'un « plan d'expérience » constitue dans ce cas une stratégie d'expérimentation pertinente.

Le succès des plans d'expériences dans la recherche et l'industrie est lié au besoin de compétitivité des entreprises : ils permettent une amélioration de la qualité et une réduction des coûts. La méthode des plans d'expériences a été mise au point au début du siècle, dans les années 1920, par Ronald A. Fisher, dans le cadre d'études agronomiques. Elle a pris un essor considérable avec le développement de l'informatique et la puissance de calcul qui l'accompagne. La grande nouveauté de la méthode des plans d'expériences est qu'elle propose une expérimentation factorielle, c'est-à-dire que tous les facteurs varient simultanément. Le traitement des résultats se fait à l'aide de la régression linéaire multiple et l'analyse de variance (Introduction aux plans d'expériences, cours P. Ozil, professeur INPG).

La régression linéaire multiple est une méthode d'analyse de données quantitatives. Elle a pour but de mettre en évidence la liaison pouvant exister entre une variable dite expliquée, que l'on notera Y et plusieurs autres variables dites explicatives que l'on notera X_1, X_2, \dots, X_k .

Les k variables $X_i, i = 1, \dots, k$ peuvent être soit aléatoires, soit contrôlées c'est-à-dire qu'elles sont connues sans erreur. Nous supposons dans la suite que les variables $X_i, i = 1, \dots, k$ sont contrôlées. Nous nous intéressons aux modèles dits linéaires, c'est-à-dire aux modèles du type:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_kX_k$$

dans lequel a_0, a_1, \dots, a_k sont des réels appelés coefficients du modèle (ici, un modèle sans interaction).

On appelle « ajustement » du modèle toute solution du système des n équations :

$$y_i = a_0 + a_1x_{i1} + \dots + a_kx_{ik} \quad (i = 1, 2, \dots, n)$$

dans laquelle :

$y_i, x_{i1}, \dots, x_{ik}$ sont les valeurs observées lors de la réalisation des expériences.

a_0, a_1, \dots, a_k les estimateurs des variables aléatoires $a_0, a_1, a_2, \dots, a_k$

Le calcul des estimateurs a_0, a_1, \dots, a_k , résulte de l'application de résultats de l'algèbre linéaire qui n'ont pas leur place ici. On obtient alors :

$$Y_{\text{observé}} = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_kX_k$$

On appelle facteurs, les paramètres supposés influencer la réponse qui caractérise le comportement du phénomène étudié. Il est important de pouvoir attribuer à chacun des facteurs deux niveaux, l'un sera qualifié de « niveau bas » l'autre de « niveau haut ». Si le

facteur est qualitatif, le niveau bas et le niveau haut correspondront à deux modalités du facteur. Dans la pratique, le niveau bas sera codé à l'aide du nombre -1 et le niveau haut à l'aide du nombre +1. Un plan pour lequel chacun des k facteurs ne possède que 2 niveaux est appelé plan $2k$.

La matrice d'expériences est le tableau qui indique le nombre d'expériences à réaliser avec la façon de faire varier les facteurs et l'ordre dans lequel il faut réaliser les expériences. Ce tableau est donc composé de +1 et de -1. On peut montrer que la meilleure précision sur les coefficients de chacun des facteurs dans la régression linéaire multiple est obtenue si l'on fait varier les niveaux de tous les facteurs à chaque expérience et si toutes les expériences concourent à l'estimation de chaque coefficient. Pour construire un plan d'expérience satisfaisant à ces conditions, les mathématiciens ont énoncé des critères d'optimalité. Les plans d'expériences sont le plus souvent construits en utilisant une matrice optimale, appelée matrice d'Hadamard. Fisher et Yates ont montré qu'une matrice orthogonale conduit à l'indépendance des estimations des coefficients du modèle. Le français Jacques Hadamard a démontré que pour obtenir en n expériences une variance minimale la matrice des effets X doit vérifier la relation: $XX' = nI_n$, où I_n est la matrice identité d'ordre n . La propriété précédente est appelée : critère d'optimalité au sens d'Hadamard.

La détermination des coefficients est ensuite réalisée en résolvant le système d'équations obtenu en suivant les tests imposés par la matrice d'expériences.

Lors de la première étape d'un plan d'expériences, appelée « screening », on suppose, comme décrit ci-dessus, que la réponse est un modèle linéaire sans interaction, c'est-à-dire qu'elle s'écrit comme une somme de chaque paramètre étudié pondéré par un coefficient. Cette étape préliminaire ne permet généralement pas de décrire exactement le phénomène étudié, car les interactions (d'ordre 2 ou 3) existent dans presque tous les cas entre des paramètres. Toutefois cette étape permet de discriminer les paramètres significatifs influant sur la réponse parmi tous les paramètres considérés au départ de l'expérience. Les étapes suivantes consistent à construire un plan d'expériences qui prend en compte les interactions entre les paramètres.

Annexe 2: Etapes du procédé de fabrication des puces en silicium fabriquées pour l'étude de l'interaction cellule/microtrou (chapitre 3).

Etapas	Type de puce						Observations
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
0 Identification plaques	X	X	X	X	X	X	Plaques Si 450 µm, polie double faces
1 Marquage de plaques	X	X	X	X	X	X	
2 Dépôt SiO ₂ TEOS 2 µm	X	X	X				
3 Dépôt SiO ₂ TEOS 7 µm				X	X	X	
4 Densification	X	X	X	X	X	X	
5 Dépôt Si ₃ N ₄ LPCVD	X	X	X	X	X	X	
6 Dépôt Si-amorphe	X	X	X	X	X	X	
7 Photolithographie FAV	X	X	X				Pour gravure des microtrous de 1,8 µm de diamètre
8 Photolithographie FAV				X	X	X	Pour gravure des microtrous de 2,5 µm de diamètre (sur-insolation pour P5 et P6)
9 Gravure sèche	X	X	X	X	X	X	Gravure du Si-amorphe
10 Gravure sèche	X	X	X	X	X	X	Gravure Si ₃ N ₄
11 Retrait résine	X	X	X	X	X	X	
12 Gravure sèche	X	X	X	X	X	X	Gravure des microtrous dans 2 et 7µm de SiO ₂ TEOS
13 Gravure humide FAV/FAR	X	X	X	X	X	X	Retrait Si-amorphe
14 Dépôt Si ₃ N ₄ PECVD FAV	X	X	X	X	X	X	Couche de protection du microtrou
15 Photolithographie FAR	X	X	X	X	X	X	Pour la gravure humide de la FAR
16 Gravure sèche	X	X	X	X	X	X	Gravure de la couche SiO ₂ FAR
17 Retrait résine	X	X	X	X	X	X	
18 Gravure humide KOH	X	X	X	X	X	X	Gravure du Si en FAR
19 Gravure sèche	X	X	X	X	X	X	Retrait Si ₃ N ₄ PECVD
20 Découpe	X	X	X	X	X	X	
21 Dépôt SiO ₂ PECVD (µm)		0,1	1,7	1,5	1,5	1,5	
22 Dépôt Si ₃ N ₄ LPCVD (µm)						0,1	

Abréviations utilisées :

FAV : face avant

FAR : face arrière

Annexe 3: Mesure des énergies de surface, résolution des méthodes Owens & Wendt et Fowkes.

Pour les deux méthodes, la relation liant l'angle de contact aux énergies de surface du liquide et du substrat est la même :

$$\sigma_L(1 + \cos \theta) - 2\left(\sqrt{\sigma_S^d \sigma_L^d} + \sqrt{\sigma_S^p \sigma_L^p}\right) = 0$$

Ce qui varie entre les deux méthodes est uniquement le mode de résolution du calcul permettant à partir des angles d'un certain nombre de liquides de connaître les composantes de l'énergie de surface du substrat. La méthode d'Owens & Wendt utilise une régression linéaire tandis que la méthode de Fowkes est une résolution d'équations.

Résolution d'Owens & Wendt

Pour résoudre selon cette méthode, on calcul la pente et l'ordonnée à l'origine d'une droite ($Y = aX + b$) définie comme suit :

$$\underbrace{\frac{\sigma_L(1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_L^d}}}_Y = \underbrace{\sqrt{\sigma_S^p}}_a \underbrace{\sqrt{\frac{\sigma_L^p}{\sigma_L^d}}}_X + \underbrace{\sqrt{\sigma_S^d}}_b$$

On détermine la pente et l'ordonnée à l'origine par régression linéaire de points (X,Y) définis comme précédemment par l'équation.

Résolution de Fowkes

Avec un liquide purement dispersif, on tire :

$$\sigma_L(1 + \cos \theta) - 2\sqrt{\sigma_S^d \sigma_L^d} = 0$$

d'où :

$$\sigma_S^d = \left(\frac{\sigma_L(1 + \cos \theta)}{2\sqrt{\sigma_L^d}} \right)^2$$

L'angle de contact et les énergies de surface du liquide sont ceux du liquide utilisé à cette étape.

Lors de la deuxième étape, on calcule la composante polaire et la solution obtenue pour l'énergie polaire est :

$$\sigma_S^p = \left(\frac{\sigma_L(1 + \cos \theta) - 2\sqrt{\sigma_L^d \sigma_S^d}}{2\sqrt{\sigma_L^p}} \right)^2$$

Annexe 4: « A silicon-based multi-patch device for ion channel current sensing », N. Picollet-D'hahan, T. Sordel, S. Garnier-Raveaud, F. Sauter, C. Pudda, F. Ricoul, F. Marcel, F. Chatelain. *Sensor Letters* Vol. 2, N°2, 2004.



A Silicon-Based “Multi Patch” Device for Ion Channel Current Sensing

Nathalie Picollet-D'hahan,^{a,*} Thomas Sordel,^a Stéphanie Garnier-Raveaud,^a Fabien Sauter,^b
Florence Ricoul,^b Catherine Pudda,^b Frédérique Marcel,^a and François Chatelain^a

^a*Commissariat à l'Energie Atomique, Département des Sciences du Vivant, Grenoble, France*

^b*Commissariat à l'Energie Atomique, Département de la Recherche Technologique, Grenoble, France*

(Received: 24 February 2004. Revised/Accepted: 19 March 2004.)

Ion channels are cellular membrane proteins that act as specific signal transducers. They play a crucial role in physiology and physiopathology, and are important drug targets. The patch-clamp technique is standard for assessing ion channel function, but the need for automation and parallelism has not yet been fulfilled. Efforts are underway to develop parallel patch-on-a-chip technologies in order to provide higher throughput and better reproducibility. Our approach is to develop a bio-electronic sandwich device, comprising a silicon-based micro-structured cell substrate held between two Printed Circuits Boards. “Multi Patch” is a “patch-on-a-chip” device where patch pipettes are replaced by micrometer-sized holes and multiple single-cell electrical signals can be monitored simultaneously. Here, we demonstrate that our silicon-based device provides Giga-Ohm seal resistivity with cells, which is the primary requirement to record ion channel activity.

Keywords: Ion Channels, Electrophysiology, Silicon, Micro Fabrication, Sensors.

1. INTRODUCTION

Ion channels are key components in cell signaling, whose dysfunctions are linked to many diseases. To date, around 30 “channelopathies” have been correlated to ion channel deficiencies, including cardiac arrhythmias, diabetes, epilepsy and cystic fibrosis, making these proteins an important class of therapeutic targets for drug development.¹ A major constraint on discovering new ion channel-based drugs has been the inability to screen ion channels with the throughputs required by the pharmaceutical industry.² Patch-Clamp is state-of-the-art technology for assessing ion channel function, able to discriminate ionic currents in the picoamp range. Even more, with this technique, it is possible to measure the current passing through a single ion channel protein in real time. As it provides a direct measurement of the functional activity of ion channels, patch-clamp is particularly suited for monitoring drugs' impact on ion channels. However, conventional patch-clamping is still a laborious manual task performed under the microscope, needing the steady hands and patience of a

very skilled experimentalist. Several new systems are under development.^{3, 4, 5, 6, 7} We present the “Multi Patch” device, combining microtechnologies, microfluidics and electrophysiology to overcome this low throughput. In short, the tip of a micropipette is replaced by a microhole structured in a planar substrate. The novelty of our approach lies in the assembly of a disposable chip with independent modules with specific functions, including fluidics and electrodes. Seal resistance measurements have been performed on laboratory conventional cells (CHO, HEK293, HeLa and Jurkat). With our technology process and fluidic design, capacitive currents and external noise of the chip were noticeably low, allowing measurements in the whole cell configuration. Silicon compatibility is evaluated through the characterization of the cell-to-chip interface. We point out the advantages of silicon in a device dedicated to record ion channel activity.

2. EXPERIMENTAL DETAILS

2.1. Device Description

In Figure 1a, the concept of the Multi Patch “sandwich” assembly is illustrated, with a silicon substrate structured

*Corresponding author; E-mail: picolletdhahan@dsvsud.cea.fr

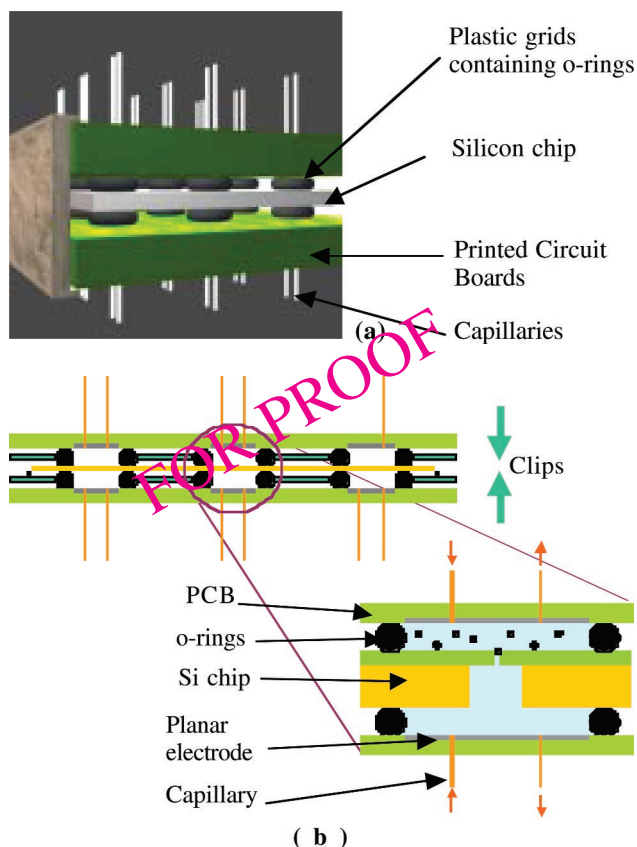


Figure 1. Multi Patch device. (a) Picture of the assembly composed of the two PCBs, the two plastic grids containing o-rings and the silicon chip. (b) On the left: cross-section of the chip with only 3 visible chambers on the scheme. On the right: an enlarged representation of one individual chamber with its own fluidic (4 capillaries per chamber) and electrical (1 pair of planar electrodes per chamber) connections.

with 9 microholes set in between two PCB (Printed Circuit Boards), with plastic grids containing o-rings and individual capillaries for fluidics. In Figure 1b, we see a cross section of the device, with 3 visible chambers and an enlargement of one of the 9 individual chambers. We will now describe the parts composing this assembly.

The chip is a multilayer silicon array of micro holes. Hydrophilic coating is obtained by Si_3N_4 or SiO_2 deposition.

The plastic grids contain individual polymer **o-rings** to define individual reservoirs and to prevent fluid leakage.

Each **PCB** contains 9 planar electrodes coated with Ag/AgCl for electrophysiologic measurements. These electrodes are drilled for the integration of fluidic capillaries. Suction is performed through the capillaries. This suction allows the control of the cell positioning and the membrane electrical sealing on a micro-hole. Cells are dispensed through the capillaries of the top PCB. Drugs and solution composition can be manipulated on either side of the cell membrane.

The assembled device is maintained together by **clips** (see vertical arrows in Figure 1b). Clips prevent leakage and isolate the device from electrical interferences. It forms 9 individual chambers for 9 separated test conditions.

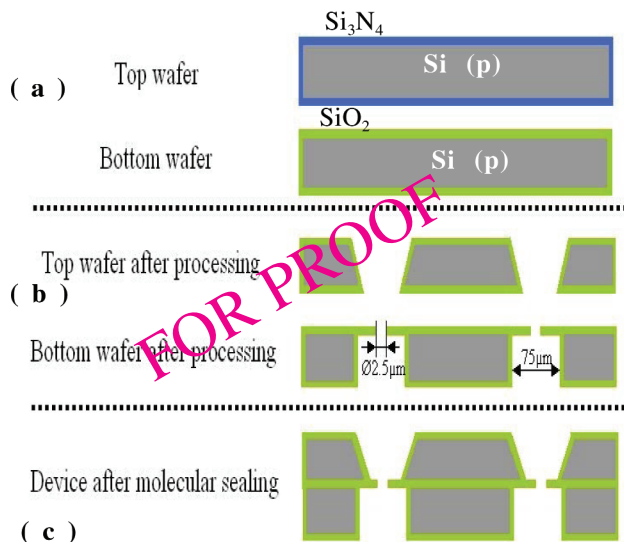


Figure 2. Silicon chip fabrication.

2.2. Microfabrication of the Silicon Chip

In Figure 2, we present a schematic description of the silicon chip fabrication process. To achieve the required geometry for planar patch clamp, we chose CMOS, double-side alignment, and both wet and dry etching technologies

- The process starts with two double-sided polished *p*-type (100) 450 μm thick silicon wafers. LPCVD nitride is deposited on the top wafer. Patterns in the nitride layer are created by contact lithography and plasma etching.
- KOH anisotropic etching is used to etch pyramids through the top wafer with a mask of silicon nitride. Afterwards, we oxidized the top wafer so as to perform the molecular sealing at medium temperature. On the bottom wafer, a thermal growth of silica is carried out in dry conditions so as to obtain a 1 μm thick silica film. Then a $\varnothing 2.5 \mu\text{m}$ cylindrical hole is etched in the silica. On the opposite side, we etch through the silica and then through the silicon a $\varnothing 75 \mu\text{m}$ cylinder using Reactive Ion Etching (RIE) techniques.
- The bottom wafer is cleaned and re-oxidized. Using a bond aligner we overlay precisely the two substrates to perform molecular sealing.

2.3. Device Handling

2.3.1. Cell Preparation

The buffer solution was first filtered with a 0.22 μm filter, and the cells were spun and aggregates discarded.

2.3.2. Cell Positioning

Mammalian cells are deposited in the micro-reservoir of the top PCB. Cells are positioned by applying a gentle suction through the micron-size hole (Figure 3).

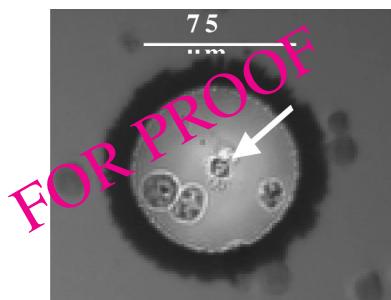


Figure 3. Cell positioning onto the microhole of the silicon chip. See (arrow) a Jurkat ($\varnothing 15\ \mu\text{m}$) centred on the micro-hole ($\varnothing 2.5\ \mu\text{m}$) and sealed by suction.

2.3.3. Electrical Measurements

For characterizing the electrical properties of the device, in particular, to determine the Seal resistance between cell and substrate, the top and bottom chambers of the substrate were filled with an electrolytic solution (sodium buffer).

The electrical connection for signal amplification and acquisition was performed using an external I/V converter and amplifier related to standard patch-clamp equipment (700 A amplifier, Axon Instruments).

Once one cell is sealed by suction, we apply a voltage between the cell and the substrate, measure the leakage current and deduce, by Ohms law, the resistance value of the contact between the cell and the SiO_2 micro-hole (Figure 4).⁸ After cell positioning, the seal was maintained for several minutes, even when the negative pressure under the micro-hole was released and when a new solution was dispensed in the base chamber.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Electrical Properties of the Silicon Substrate

Many disadvantages of silicon-based substrates have been pointed out⁹ and, in particular, those associated with its semiconducting properties. Even if the 0.8 Mohm resistance of the empty device is close to the resistance obtained with standard patch-clamp micropipette, we indeed observed higher capacitive currents with our planar Multi Patch than with a conventional micropipette. Such high capacitance and leakage current have already been described with similar devices as a serious disadvantage.⁹ In our device, this is probably due to the Si-based device, as it forms two good capacitors constituted by a sandwich between the electrophysiologic medium of the top chamber, the isolating SiO_2 membrane, the semiconductor probe, and again the isolating SiO_2 membrane and the electrophysiologic conductive medium of the base chamber. However, by modifying the SiO_2 thickness, we have been able to reduce the high capacitance to less than 8 pF. Moreover, we circumvented this problem by using a low-doped (p-) Si wafer ($\rho = 14\text{--}22\ \text{Ohm.cm}$ of resistivity).

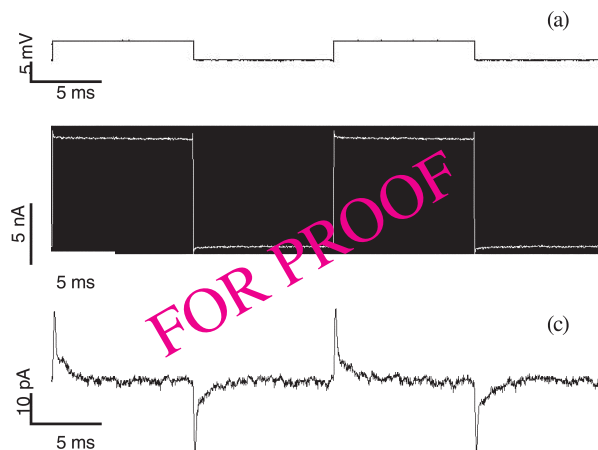


Figure 4. Measurement with the Multi Patch device (a) Voltage test pulse for the resistance measurement. (b) Current response for an open microhole ($\varnothing 2.5\ \mu\text{m}$): $R = 0.6\ \text{Mohm}$. (c) Current response of the same microhole with an attached HEK cell: $R = 2\ \text{Gohm}$.

This low capacitance is required to work in the whole-cell configuration and to measure extremely fast acting membrane channel currents.

3.2. Cell-to-Chip Interface

The resistance of the cell-substrate interface increases from 0.8 Mohm for the empty device to 500 Mohm after 10–20 seconds of suction of a cell over the micro-hole, and finally to 1 Giga-Ohm after an additional 10–60 seconds of suction impulses. A Giga-Ohm Seal is obtained consistently with a 40% success rate ($n = 20$). Several parameters such as micro-hole size and shape, surface chemistry and roughness, and SiO_2 layer thickness, are critical for the Giga-Ohm seal formation.

3.2.1. Micro-Holes Size and Shape

The silicon substrate fabrication process includes several steps performed in a clean room environment. The main difficulty of this geometry consists in etching a tiny hole—consistent with the size of the tip of patch-clamp micropipette—through the SiO_2 membrane located at the bottom of the silicon $\varnothing 75\ \mu\text{m}$ reservoir. This is aggravated by the double-side alignment and molecular sealing. The process is now stabilized and transferred for mass production with an exquisite control of the diameter of the micro-holes. In our case, the $2.5\ \mu\text{m}$ diameter of the micro-hole allows us to achieve high resistive seals. But, if the step of breaking the cell membrane to obtain the “whole-cell configuration” requires smaller diameters, an alternative technology allows us to reduce the micro-hole diameter even below $1\ \mu\text{m}$. In Figure 5, we show SEM pictures of the reservoirs and micro-holes. Holes are obtained with a perfect round shape. The size of the holes can vary from 1.5 to $5\ \mu\text{m}$ in diameter, compatible with obtaining of a Giga-Ohm seal.⁹

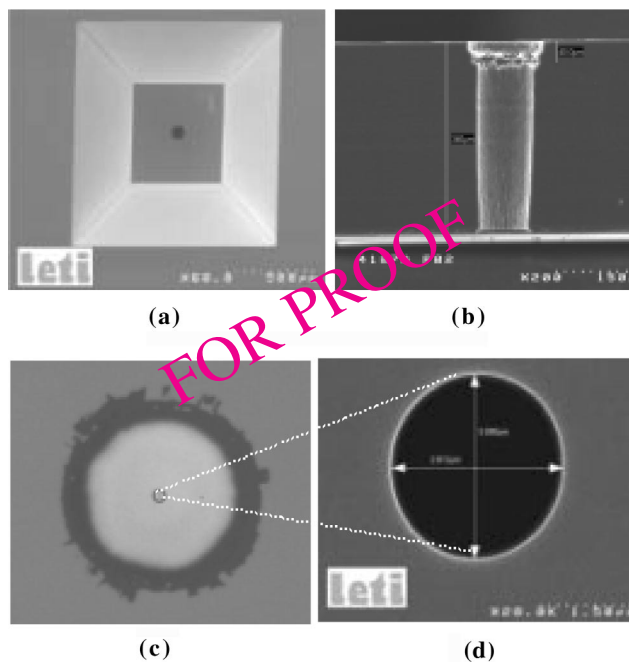


Figure 5. SEM pictures of the reservoirs and micro holes (a) Silicon reservoir to locate a cell above the patch-clamp hole. (b) Side view of the tube cell aspiration. (75 μm in diameter, cleaved Si substrate). (c) View of the reservoir with the microhole at the bottom. (d) Enlarged top view of a microhole.

3.2.2. Surface Chemistry and Roughness

The silicon chips are coated with Si_3N_4 or SiO_2 in order to obtain a hydrophilic surface. The hydrophilic surface minimizes the probability of bubble trapping in the neighborhood of the hole provided for the measurement of the ion channel activity. The surface roughness of the parts in contact with the cell is very low, as obtained by KOH etching of (100) and (111) crystalline planes of single-crystal silicon. Hydrophilic surface and low roughness have been reported as critical parameters to obtain Giga-Ohm seals.⁴

3.2.3. SiO_2 Layer Thickness

Consistent with the obtaining of Giga-Ohm seals, the relatively high thickness of the SiO_2 layer (1 to 2 μm) provides sufficient surface contact between the hole walls and the cell membrane. It has been shown that it was not the case with apertures situated in a thin (200 nm), freestanding membrane of Si_3N_4 .⁹

3.3. Multi Patch Perspectives

Our preliminary results allow us to qualify silicon as a material suited for planar patch-clamp. Electrical characterization was carried out on several types of cells (Jurkat, CHO, HEK), in order to assess the biocompatibility of the device with conventional cell cultures, expressing different classes of ion channels (results not shown). The final vali-

ation remains to be made by ion-current measurements, using conventional patch-clamp electronics.

Silicon wafer processing allows the parallel fabrication of many chips at decreasing cost. In addition, silicon allows for a very high level of microelectronic integration, and we are considering the complete integration of fluidics, electrodes and micro-holes on the same silicon substrate.

We also expect to improve the Giga seals rate with specific surface treatments and appropriate preparation of the cell suspension. Moreover, a new fluidic device, designed to position cells more efficiently on micro-holes, will be adapted to the Multi Patch sandwich.

4. CONCLUSIONS

In this paper, we have presented a silicon-based device designated for planar patch-clamp. We have shown the achievement of reproducible Giga-Ohm Seal on small cells. This modular device constitutes a very flexible and versatile tool for non-experts in electrophysiology. The present design allows for incorporating biological-based activation, since it integrates appropriate fluidics for making, in the near future, parallel patching. The silicon substrate gives the accuracy and reproducibility required for future devices and electronics on chip.

Acknowledgments: We acknowledge support from the CEA Grenoble. This project relies on skills in electronics, plastic technology and components (CEA-LETI),¹⁰ biophysics and cellular biology (CEA-DSV).¹¹ We thank our partners from the CEA for micro-system development and electro-physiology platforms. Special thanks to M. Villaz, M. De Waard and M. Vivaudou for their helpful advice in electrophysiology, and P. Caillat for the microtechnology support.

References and Notes

1. B. A. Niemeyer, L. Mery, C. Zawar, A. Suckow, F. Monje, LA Pardo, W. Stühmer, V. Flockerzi, and M. Hoth, *EMBO Reports* 21, 568 (2001).
2. D. Owen and A. Silverthorne, *Drug Discovery World* 48 (2002).
3. J. Xu, X. Wang, B. Ensign, M. Li, L. Wu, A. Guia, and J. Xu, *Drug and Discovery Today* 6, 1278 (2001).
4. F. J. Sigworth and K. G. Klemic, *Biophys. J.* 82, 2831 (2002).
5. N. Fertig, R. H. Blick, and J. C. Behrends, *Biophys. J.* 82, 3056 (2002).
6. N. Fertig, M. Klau, M. George, R. H. Blick, and J. C. Behrends, *Appl. Phys. Lett.* 81, 4865 (2002).
7. K. G. Klemic, J. F. Klemic, M. A. Reed, and F. J. Sigworth, *Biosens. Bioelectron.* 17, 597 (2002).
8. R. Penner, in *Single-Channel Recording* (2nd ed), Plenum Press, 3 (1995).
9. N. Fertig, M. George, M. Klau, C. Meyer, A. Tilke, C. Sobotta, R. H. Blick, and J. C. Behrends, *Receptors and Channels* 9, 29 (2003).
10. CEA-LETI: Commissariat à l'Energie Atomique. Grenoble, France. Laboratoires d'Electronique et Technologies de l'Information.
11. CEA-DSV: Commissariat à l'Energie Atomique. Grenoble, France. Direction des Sciences du Vivant.

Annexe 5: « Hourglass SiO₂ coating increases the performance of planar patch-clamp », T. Sordel, S. Garnier-Raveaud, F. Sauter, C. Pudda, F. Marcel, M. De Waard, C. Arnoult, M. Vivaudou, F. Chatelain and N. Picollet-D'hahan. Journal of Biotechnology, Vol. 125, 1, p 142-154, 2006.

Hourglass SiO₂ coating increases the performance of planar patch-clamp

Thomas Sordel^{a,1}, Stéphanie Garnier-Raveaud^{a,1}, Fabien Sauter^b, Catherine Pudda^b,
Frédérique Marcel^a, Michel De Waard^c, Christophe Arnoult^c, Michel Vivaudou^d,
François Chatelain^a, Nathalie Picollet-D'hahan^{a,*}

^a Laboratoire Biopuces, CEA, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

^b Laboratoire Composants Intégrés pour le Vivant, LETI, CEA Grenoble, France

^c Laboratoire Canaux Calciques, Fonctions et Pathologies, INSERM U607, CEA Grenoble, France

^d Laboratoire Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CEA Grenoble, France

Received 20 July 2005; received in revised form 31 January 2006; accepted 17 February 2006

Abstract

Obtaining high-throughput electrophysiological recordings is an ongoing challenge in ion channel biophysics and drug discovery. One particular area of development is the replacement of glass pipettes with planar devices in order to increase throughput. However, successful patch-clamp recordings depend on a surface coating which ideally should promote and stabilize giga-seal formation. Here, we present data supporting the use of a structured SiO₂ coating to improve the ability of cells to form a “seal” with a planar patch-clamp substrate. The method is based on a correlation study taking into account structure and size of the pores, surface roughness and chip capacitance. The influence of these parameters on the quality of the seal was assessed. Plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD) of SiO₂ led to an hourglass structure of the pore and a tighter seal than that offered by a flat, thermal SiO₂ surface. The performance of PECVD chips was validated by recording recombinant potassium channels, BK(Ca), expressed in stable HEK-293 cell lines and in inducible CHO cell lines and low conductance IRK1, and endogenous cationic currents from CHO cells. This multiparametric investigation led to the production of improved chips for planar patch-clamp applications which allow electrophysiological recordings from a wide range of cell lines.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Planar patch-clamp; BK(Ca) channels; Inducible expression system; IRK1 channels; PECVD coating; AFM; SEM

1. Introduction

Ion channels represent a large family of potential drug targets (Venter et al., 2001; Wang and Li, 2003), and are thus under scrutiny in the drug discovery/screening process. However, the lack of

* Corresponding author. Tel.: +33 4 38 78 67 78;
fax: +33 4 38 78 59 17.

E-mail address: picolletdhahan@dsvsud.cea.fr
(N. Picollet-D'hahan).

¹ These authors contributed equally to this work.

high-throughput assays has hampered this process and still constitutes a bottleneck in lead optimization steps (Xu et al., 2004; Wood et al., 2004). Since 1998, efforts have been made to automate electrophysiology (Xu et al., 2004) and several important technological advances have been made. To increase the throughput of patch-clamp recordings, attempts have been made to replace the traditional pipette with a planar substrate. Glass was the first material used in planar patch-clamp recordings as this material exhibits good dielectric properties and interacts well with membrane lipids (Fertig et al., 2003). A wide range of other materials and sometimes a hybrid assembly of different materials have also been tested: PDMS (Sigworth and Klemic, 2002; Klemic et al., 2005), a SiO₂-coated plastic foil (Wang and Li, 2003), SiO₂-coated silicon chips (Asmild et al., 2003), quartz (Stett et al., 2003b) and encapsulated silicon chips in a plastic matrix (Seo et al., 2004).

Whilst high success rates in seal formation have been documented with glass-made chips (Fertig et al., 2002; Xu et al., 2003), microstructuring processes involving glass remains complex and requires specific equipment. Therefore, as an alternative to glass, we aimed at the development of a silicon wafer-based device since silicon is “the most versatile substrate for constructing integrated systems” (Pantoja et al., 2004). Namely, the production of silicon-based chips coated with a SiO₂ layer offers high accuracy and flexibility of microstructuration and surface functionalisation.

Many authors have explored silicon for their planar patch-clamp biochips development but most of them did not report ion channel activity measurements (Cheung et al., 2002; Matthews and Judy, 2003; Pandey et al., 2004; Lehnert et al., 2002; Kosar et al., 2003). Some have employed silicon devices to investigate artificial membranes but could not achieve measurements on cells (Schmidt et al., 2000). Some groups have built silicon-based device platforms and characterized them across a diverse group of cell types (Pantoja et al., 2004) but feasibility was demonstrated using very simple device assemblies. Overall, no systematic comparative study of chips properties focused on seal quality has been reported. Today, only two planar patch-clamp chips with a silicon oxide surface are commercially available (Kutchinsky et al., 2003; Schroeder et al., 2003). While one system (silicon-

based chip coated with SiO₂) has provided screening data and characterization of potassium channel modulators (Kutchinsky et al., 2003), the other one (plastic-based chip coated with SiO₂) generates seals often formed with sub-gigaohm resistances (Schroeder et al., 2003).

The seal success rate is highly dependent on the technology, ranging from 20 to 90% (Terstappen, 2005). It also strongly depends on the cell type used (Stett et al., 2003a; Owen and Silverthorne, 2002) and on the surface coating that has yet to be defined (Xu et al., 2003) because of the complex nature of the seal. Therefore, the optimization of planar patch-clamp cell sealing involves both biological and technological approaches. Some authors introduced new procedures in order to improve the quality of the cell suspension (Bruggemann et al., 2003) or to optimize the identification of cells that are suitable for patch-clamping (Mc Dowell and Gray, 2004).

This paper describes a study on surface coatings for the improvement of planar patch-clamp chips. Our method is based on the modification and characterization of the dimension and shape of the pores, surface roughness and chip capacitance in relation to the quality of the seal. This approach has led to a model of PECVD SiO₂ coating defining an “hour-glass” shape of the hole. We demonstrate that by decreasing the size of the microhole and by modifying shape and roughness, the seal resistance was enhanced compared to flat thermal SiO₂. In addition, decreasing chip capacitance allowed recording of ion channels of low conductance and endogenous channel activities in a whole-cell configuration mode. Two transfected cell lines (CHO and HEK-293) displayed the electrophysiological signatures of the expected BK(Ca) (or K_{Ca} 1.1) and IRK1 (or Kir 2.1) potassium channel activities and those of cationic endogenous channels. Moreover, our patch-clamp system was validated using an inducible expression system in CHO cells, in order to demonstrate its ability to record different ranges of current magnitude in a single cell model.

Our approach relies on a growing database of experimental correlations allowing the optimization of chip design. Results with the controlled ion channel expression provided with the Tet (Tetracycline)-on inducible expression system open new applications in planar

Table 1
Effect of SiO₂ PECVD deposition on typical electrical characteristics of chips

SiO ₂ e_d thickness (μm)	ϕ_d microhole (μm)	Microhole resistance (R_h , $\text{M}\Omega$)		Capacitance (C , pF)	
		R_h (th)	R_h (exp)	C (th)	C (exp)
0	2.50	0.46	0.55	70	75
0.5	2.20	0.62	0.65	62	— ^a
1.0	1.95	0.87	0.85	58	— ^a
1.5	1.70	1.24	1.15	51	54

Three different PECVD SiO₂ thicknesses (e_d) were investigated: 0.5, 1 and 1.5 μm . Microhole diameter (ϕ_d) measured with SEM, theoretical (th) and experimental (exp) microhole resistance (R_h) and cell-patch site capacitance (C) are reported for each type of PECVD deposit. Resistance was calculated according to Eqs. (1) and (2) using model 2 (see text) and capacitance according to Eqs. (3) and (4) (see text). A good correlation of resistance and capacitance with the thickness of PECVD SiO₂ layers was observed.

^a No measurement performed.

patch-clamp toward parallel whole-cell and single ion channel recordings in a mammalian cell line.

2. Material and methods

2.1. Device assembly

The patch-on-a-chip device has been described previously (Picollet-D'Hahan et al., 2004). The chip consists of 9 independent cell-patch sites, each defined by a couple of *o*-rings (inner diameter, i.d. = 3 mm; outer diameter, o.d. = 5 mm) acting as walls of individual chambers. The so-defined top and bottom compartments communicate through a hole of 2.5 μm diameter in a 2.12 μm thick silica membrane. The compartments are connected to a network of microfluidic capillaries, allowing solutions to be supplied and exchanged independently. Two printed circuit boards (PCB) with 9 Ag/AgCl planar electrodes were clamped on either side of the silicon substrate and connected to a patch-clamp amplifier.

2.2. Chip passivation

Two types of chips were studied: chips coated with a SiO₂ layer grown by thermal oxidation (thermal SiO₂) and chips with an additional PECVD SiO₂ layer on the upper side. The fabrication process of the chips has been described previously (Picollet-D'Hahan et al., 2004). PECVD was deposited at 300 °C with a rate of 1300 Å/min. This resulted in a 0.5–1.5 μm thick layer. Three PECVD SiO₂ layer thicknesses were investi-

gated (Table 1) and studied in terms of chip resistance and capacitance values.

2.3. Atomic force microscopy measurements

Atomic force microscopy (AFM) experiments were performed with a DimensionTM 3100 AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) and a Nanoscope IV controller (Digital Instruments) equipped with a large-range scanner (maximum XY scan range of 90 μm \times 90 μm with vertical Z range of 6 μm).

Measurements were obtained in the AFM tapping mode. The tips were supplied by Nanosensor (Reference NCH 50, f_0 = 300 kHz; K = 40 N/m). The cantilever was made of silicon with an aluminium coating. The dimensions of the cantilever were: thickness = 4 μm ; length = 125 μm ; width = 35 μm . Tip heights were 10 to 15 μm , tip radius was 10 nm and half cone angle was greater than 10°.

2.4. Cell preparation

Human Embryonic Kidney 293 (HEK-293) cells were stably transfected with pcDNA3.1-HA-mBKc (Creacell, La Tronche, France), a plasmid construct carrying the coding sequence of mBKc (mSlo A48206). The cells were cultured in flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (V/V) foetal calf serum, 1.2 mg/ml geneticin, 1% penicillin–streptomycin and 1% L-glutamine. Chinese hamster ovary (CHO) cells were stably transfected with pcDNA3.1-HA-mIRK1 (Creacell), a plasmid carrying the coding sequence of the IRK1 protein. The

cells were cultured in Ham F12 medium supplemented with 10% (V/V) foetal calf serum, 1.2 mg/ml geneticin, 1% penicillin–streptomycin and 1% L-glutamine in flasks. A stable CHO cell line expressing BK(Ca) channels in a tetracycline-dependent manner was constructed according to Trapani and Korn (Trapani and Korn, 2003) and provided by Creacell. Cells were cultured in Ham F12 medium supplemented with 10% (V/V) foetal calf serum, 1.2 mg/ml geneticin, 1% penicillin–streptomycin, 1% L-glutamine, 10 μ g/ml blasticidin and 200 μ g/ml zeocin in flasks. To initiate BK(Ca) channel expression, tetracycline (Tet) was added to the maintenance media at a concentration of 1 μ g/ml. At the desired incubation time, and thus the desired channel expression level, cells were prepared according to the following method.

Cells were pre-washed with phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). To detach the cells prior to the experiment, accutase, rather than trypsin/EDTA, proved to be most effective (Tao et al., 2004). Accutase-isolated cells revealed better membrane integrity and optimized morphology. In addition, this enzyme has been reported not to alter ion channel functionality. The number of aggregates was reduced and the suspension was more homogeneous, something particularly important to precisely immobilize one individualized cell onto the microhole. After detachment, cells were centrifuged at $360 \times g$ and resuspended in a mixture of PBS/Accumax at a concentration of 2×10^5 cells/ml and kept at 4 °C under agitation. Immediately prior to the planar patch-clamp experiments, the cells were concentrated by centrifugation to 5×10^5 cells/ml in electrophysiological solution.

2.5. Electrophysiology

Experimental conditions were similar to those used in conventional patch-clamp experiments, where the “bath” solution becomes the upper chamber solution and the intrapipette solution the lower chamber solution. The upper chamber solution contained (in mM): 118 NaCl, 5.6 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, 11 glucose, pH 7.4 (with NaOH), conductivity 1.32 S/m. In inhibition experiments, BaCl₂ and iberiotoxin (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) were added. The lower chamber contained (in mM):

30 KCl, 110 K-aspartate, 1 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, pH 7.3 (with KOH), conductivity 1.17 S/m. Experiments were conducted at room temperature (20 °C) and cells were studied in the whole-cell mode. For each experiment, one microhole out of nine was examined as follows: the bottom chamber of the device was filled with the solution first, followed by the upper chamber. Care was taken to eliminate bubbles in the fluidic circuit. Microhole resistance (R_h) was monitored by applying a square wave of voltage (5 mV amplitude and 10 ms duration) across the microfluidic chambers through the microhole with Ag/AgCl electrodes. The cellular suspension was then injected into the upper chamber (~ 2500 cells/chamber) and a negative pressure of -100 to -200 mbar was applied to the lower chamber in order to attract one cell onto the microhole while simultaneously monitoring patch resistance. This phase of the process was successfully completed within 30 s. The negative pressure was maintained to promote contact between the cell membrane and microhole walls and released following the establishment of a high-resistance seal. Whole-cell configuration was obtained by applying a 1 V pulse during 100 μ s to snap the isolated membrane patch. Subsequently, voltage control and current recordings from the cell membrane were performed.

Acquisition was performed with the Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments, Union City, USA). All traces were sampled at 20 kHz and filtered at 2 kHz. Current–voltage (I – V) relationships were obtained using voltage steps from 0 to +120 mV with 10 mV increments over 400 ms for BK(Ca) and tetracycline-regulated BK(Ca) channels, and from +60 to -120 mV in 10 mV steps during 200 ms for IRK1 channels. For patch-clamp measurements with micropipette currents were obtained with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments), all traces were sampled at 20 kHz and filtered at 2 kHz.

3. Results

High-resistance seals were previously obtained with non-transfected Jurkat cells on 2.5 μ m diameter holes structured in a 2 μ m thick silica membrane (Piccollet-D'Hahan et al., 2004). When testing other cell lines, we observed that, as expected, seal resistance values

depended on cell type. In addition, the seals did not prove to be tight enough for whole-cell mode measurements of transfected CHO cells. Thus, we explored novel ways to modify cell-patch site parameters such as microhole size, shape and surface properties. Hydrophilic surfaces had been previously shown to promote the attachment of hydrophilic cell membranes (Corey and Stevens, 1983). Therefore, the chip surface was passivated with SiO₂ PECVD leading to a more hydrophilic surface. In addition, the PECVD coating was expected to reduce the microhole diameter to less than 2.5 µm and thus to lead to higher hole resistance values and possibly higher seal resistance values. Chips with a thermal SiO₂ surface layer and chips with an additional PECVD SiO₂ layer on the upper side were used to assess the effect of the additional PECVD layer on the performance of the chip in terms of pore dimension, pore shape, surface roughness, chip capacitance and then weighed against seal quality.

3.1. PECVD SiO₂ coating alters the physical properties of microholes

Both thermal and PECVD SiO₂-coated chips were observed by electron microscopy in order to determine microhole size and shape. On thermal SiO₂ chips, the nominal microhole diameter of 2.5 µm showed a well-defined circle (Fig. 1A). A 1.5 µm PECVD layer reduced the microhole diameter to 1.7 µm while introducing roughness around the aperture (Fig. 1B).

The influence of the passivation process on surface topography was analysed by atomic force microscopy (AFM). The thermal SiO₂ surface appeared extremely clean and homogeneous (Fig. 1C). In contrast, asperities and irregularities were present on the thick PECVD SiO₂ surface (Fig. 1D). The root mean square of the roughness was calculated for an area of 1 µm², with a value of 2.4 ± 0.1 Å on thermal SiO₂ surfaces, which is close to the values usually measured on polished silicon wafers with a native oxide (around 1 Å). While the roughness was usually around 5–6 Å RMS on 0.1 µm PECVD SiO₂ surfaces in our hands (not shown), a rougher surface of 25.5 Å RMS was measured here for a 1.5 µm thick PECVD SiO₂ deposit. This difference may be due to deposition parameters such as temperature and kinetics.

3.2. Modelling of patch-site resistance and capacitance

Reproducibility and accuracy of the SiO₂ PECVD process were evaluated by measuring the microhole resistance R_h of each chip for the different thicknesses of the PECVD SiO₂ layer: 0, 0.5, 1 and 1.5 µm. R_h , an indirect measure of microhole diameter, was determined for a device that contained the intrapipette saline solution but no cells. The results showed a clear correlation between resistance and diameter (Table 1). Typically, the mean experimental resistance for a 2.5 µm diameter aperture was 0.55 ± 0.1 MΩ and increased to 1.15 ± 0.1 MΩ with a 1.5 µm SiO₂ layer. In order to further investigate the influence of PECVD SiO₂ deposition on R_h , two models were developed to study the importance of the microhole shape. System resistance can be modelled by only taking into account the cell-patch site resistance (Matthews and Judy, 2003). The cell-patch site can be modelled as a conductor with a resistance that matched that of the intrapipette solution in the microhole (Fig. 2A). In model 1, it was assumed that the PECVD deposition led to a cylindrical shape of the aperture (Fig. 2B). Theoretical values reported in Fig. 2D were calculated using Eq. (1) giving the resistance for a cylindrical shape as a function of electrolyte resistance ρ , hole height l and surface S of the aperture:

$$R_h = \rho \frac{l}{S} \quad (1)$$

Fig. 2D shows that the theoretical microhole resistance values which were calculated on the basis of a cylindrical shape are greater than the experimental values.

In model 2, which is based on scanning electron microscopy (SEM) observations (Fig. 1B), it was assumed that PECVD deposition led to an “hourglass” shaped hole. It was expected that holes would have the axial symmetry depicted in Fig. 2C and an ellipsoidal curve was used to model the shape of holes. The equation allowing the determination of the microhole diameter as a function of the height z is

$$\phi = \phi_0 - (\phi_0 - \phi_d) \left[1 - \left(\frac{2z}{(e_d + e_0)} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

with the initial microhole diameter $\phi_0 = 2.5$ µm, the measured microhole diameter ϕ_d after PECVD deposition, the thermal SiO₂ thickness e_0 and the deposit

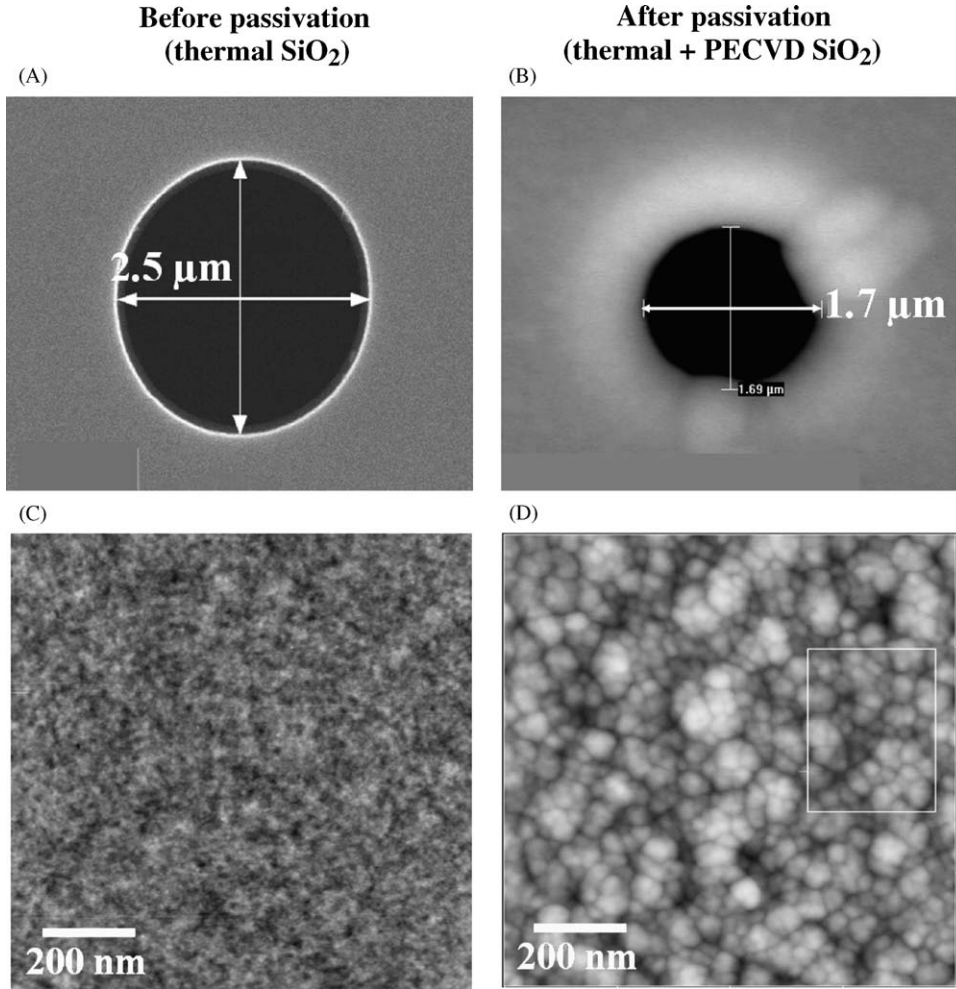


Fig. 1. Cell-patch site made of thermal SiO₂ (left column) and PECVD SiO₂ (right column). Microhole diameter determination on scanning electron (SE) micrographs before (A) and after (B) passivation (1.5 μm thick SiO₂ layer). Surface roughness visualization on AFM pictures before (C) and after (D) passivation of the same chips.

thickness e_d . Eq. (1) was discretized on the total height ($e_d + e_0$) in order to calculate theoretical resistances. Fig. 2D and Table 1 show good agreement between the average resistance of four different cell-patch site diameters and the modelled cell-patch site resistance.

In our device (Fig. 2A), the Si-based structure leads to a high capacitance since it functions as a capacitor between the electrophysiological medium of the upper (zone A) and lower (zone D) chambers and the isolating SiO₂ layers (zone B divided in B₁ and B₂) on either side of the silicon layer (zone C). The model for the capacitance is provided by Eq. (3) where C_{PS} stands

for the total capacitance of the cell-patch site, C_{AD} and C_{AC} for the front and C_{CD} for the back capacitances:

$$C_{PS} = C_{AD} + \left(\frac{1}{C_{AC}} + \frac{1}{C_{CD}} \right)^{-1} \quad (3)$$

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{S}{d} \quad (4)$$

The capacitances reported in Table 1 were calculated using Eqs. (3) and (4), with the insulating layer dielectric constant ϵ_r (4.5 for SiO₂), the surface S of the surrounding fluid, and the layer thickness d . In our

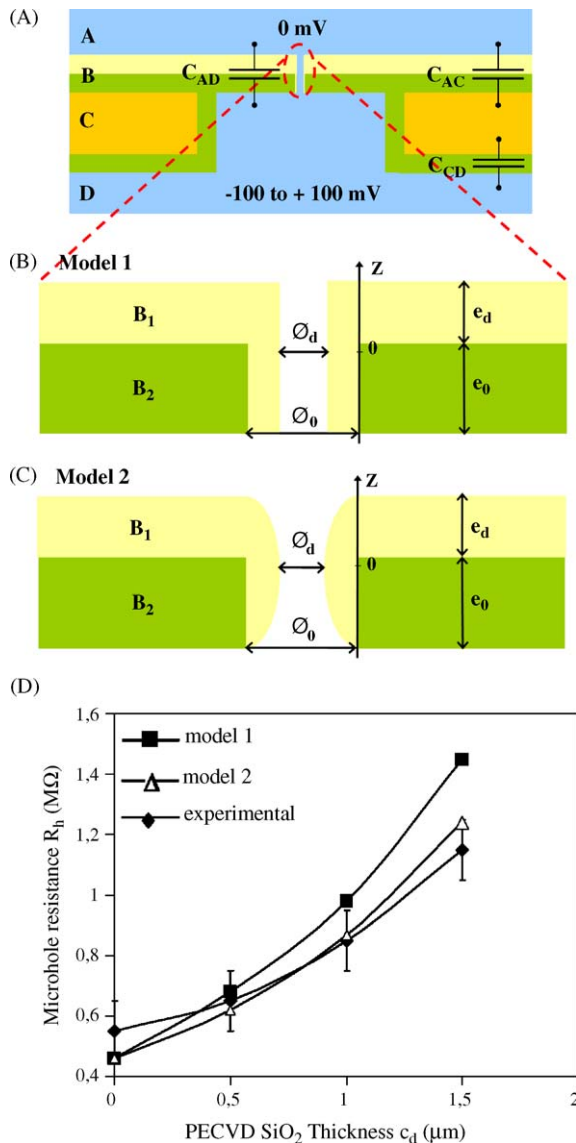


Fig. 2. Schematic cross section representation of silicon chip capacitance (not scaled) and modelled cell-patch site resistance and measurements. Top view A: two capacitors are formed by the conducting parallel plates of electrophysiological medium (zones A and D) and the silicon substrate (zone C) separated by the SiO₂ dielectric layer (zones B₁ and B₂). B₁ represents the PECVD SiO₂ layer and B₂ the thermal SiO₂ layer. Views B and C: enlarged view of the microhole depicting the aperture shape following the deposition process modelled by model 1 (view B) and model 2 (view C) ($e_0 = 2.12 \mu\text{m}$, $\phi_0 = 2.5 \mu\text{m}$, e_d is the PECVD SiO₂ thickness and ϕ_d the microhole diameter after deposition). Bottom view D: three SiO₂ thicknesses are reported with corresponding experimental and theoretical microhole resistance values. The curve (■) presents resistance values

configuration, C_{AD} was considered as insignificant because the surface of the microhole SiO₂ membrane was only 0.004 mm^2 compared to the 7 mm^2 taken into account for the C_{AC} and C_{CD} contributions.

As expected, the cell-patch site capacitance, measured with a 263 A potentiostat and a 1025 frequency response detector (Princeton Applied Research, Oak Ridge, USA) was reduced after PECVD passivation. Capacitance measurements performed before and after the deposition of a $1.5 \mu\text{m}$ PECVD layer showed a good correlation with theoretical results (Table 1).

3.3. PECVD SiO₂ coating improves seal frequency and quality

Chips with a thermal SiO₂ layer and chips with a $1.5 \mu\text{m}$ thick PECVD layer were experimentally characterized by evaluating seal values and cell membrane stability on the substrate whereas the two others intermediate PECVD thicknesses (0.5 and $1 \mu\text{m}$) were used to study the evolution of microhole shape during the deposition process. Cell trapping and sealing were performed as described in Section 2. The influence radius of suction through the microhole in which a cell is attracted was experimentally observed to be around $30\text{--}50 \mu\text{m}$. Under this condition, cells in suspension within a distance of $40 \mu\text{m}$ could be reliably positioned on the microhole and remained in this position even when the negative pressure was released. Immediately after trapping the cell, a negative pressure ranging from 0 to -250 mbar was applied and the cell formed a seal on the patch aperture. The results indicate that PECVD SiO₂ passivation increased the seal success rate from nearly 0% (no seal greater than $100 \text{ M}\Omega$ on $n = 30$ measurements without a PECVD layer) to 23% (37 seals higher than $100 \text{ M}\Omega$ on $n = 157$ measurements with the PECVD layer). Taking into account all seals, the mean resistance of a cell on microhole varied from $30 \text{ M}\Omega$ without PECVD layer ($n = 30$) to $155 \text{ M}\Omega$ ($n = 157$) with PECVD layer. More precisely, with a PECVD layer, 19 seals out of 37 are set in a range of $100\text{--}200 \text{ M}\Omega$, four seals in a range of $200\text{--}500 \text{ M}\Omega$,

theoretically calculated with model 1 (see text) and the curve (Δ) presents those predicted with model 2. Experimental results (on $n = 5$) are reported on curve (\blacklozenge). A good correlation between experimental resistance and theoretical resistance values according to model 2 was observed.

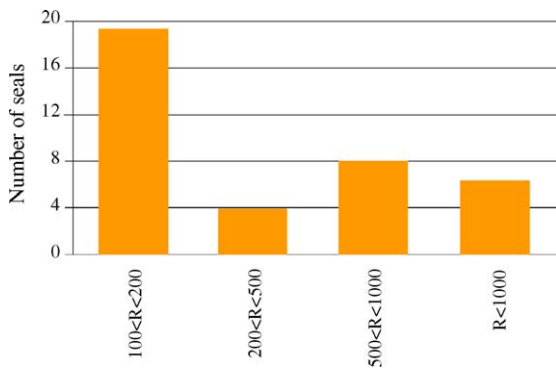


Fig. 3. Distribution of seal resistances. Distribution of seal resistances higher than 100 MΩ obtained on chips with SiO₂ PECVD layer.

eight seals in a range of 500–1000 MΩ and six seals superior to 1 GΩ (Fig. 3). The highest seal resistance reached 7 GΩ.

3.4. Low conductance and endogenous current recordings

Potassium currents were recorded from HEK-293 cells stably expressing BK-type Ca²⁺-activated channels. Current traces in Fig. 4A represent the response to voltage sweeps from 0 to +120 mV (in 10 mV increments) during 400 ms without leak subtraction and demonstrate the effects of iberiotoxin (IBTX, 100 nM), a selective blocker of this channel type (Fig. 4B). Under these conditions, the outward currents were strongly inhibited by IBTX. The curves describing the current–voltage relationship, after leak current com-

pensation, indicate an 88% inhibition of BK(Ca) channels at +120 mV (Fig. 4B).

In order to test the setup with different cell lines and different types of channels, inward rectifier IRK1 channels were analysed using transfected CHO cells. Potassium currents were elicited by voltage sweeps from +60 to −120 mV (in 10 mV decrements) for 200 ms. Data recorded using conventional micropipettes, provided in Fig. 5A, show good agreement with planar patch-clamp data (Fig. 5B). Inward rectifying currents were inactivated in the presence of 1 mM BaCl₂ (Fig. 5) and 10 mM BaCl₂ (Fig. 6). The Ba²⁺ block of the inward current reversed readily upon washout (Fig. 6).

Whereas 1 mM BaCl₂ did not affect the outward current at positive potential, 10 mM BaCl₂ led to the activation of cationic endogenous channels (Fig. 6). Upon washout, this cationic current disappeared.

In order to record different ranges of channel currents on our device, we produced and recorded stable mammalian cell lines with inducible channel expression (Trapani and Korn, 2003). Briefly, channel expression was under the control of a competition between constitutively expressed Tet repressor protein and exogenously added tetracycline. In the absence of Tet, the Tet repressor protein was bound to the Tet operator and expression was prevented. Incubation of cells with Tet resulted in the displacement of the Tet repressor protein from the Tet operator and expression occurred (Trapani and Korn, 2003). Fig. 7 illustrates the time-dependent increase in expression with Tet incubation. Cells were incubated for the time denoted on the abscissa. Fig. 7 illustrates whole-cell current

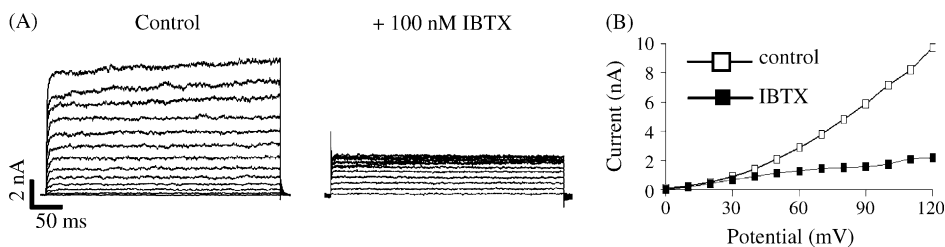


Fig. 4. Whole cell K⁺ currents recorded from BK(Ca) channels with the chip device. Current recordings were performed in the whole-cell configuration from HEK-293 cells expressing BK-type Ca²⁺-activated channels. (A) Outward rectifying potassium currents elicited with activating voltage steps from a holding potential of 0 to +120 mV with 10 mV increments. Seal resistance: 150 MΩ. Whole-cell measurements demonstrate the specific inhibitor effect of the scorpion peptide toxin iberiotoxin (IBTX) on BK(Ca) channels. Outward K⁺ currents were significantly reduced by 100 nM IBTX. (B) Current–voltage relationship curve obtained from previous current traces.

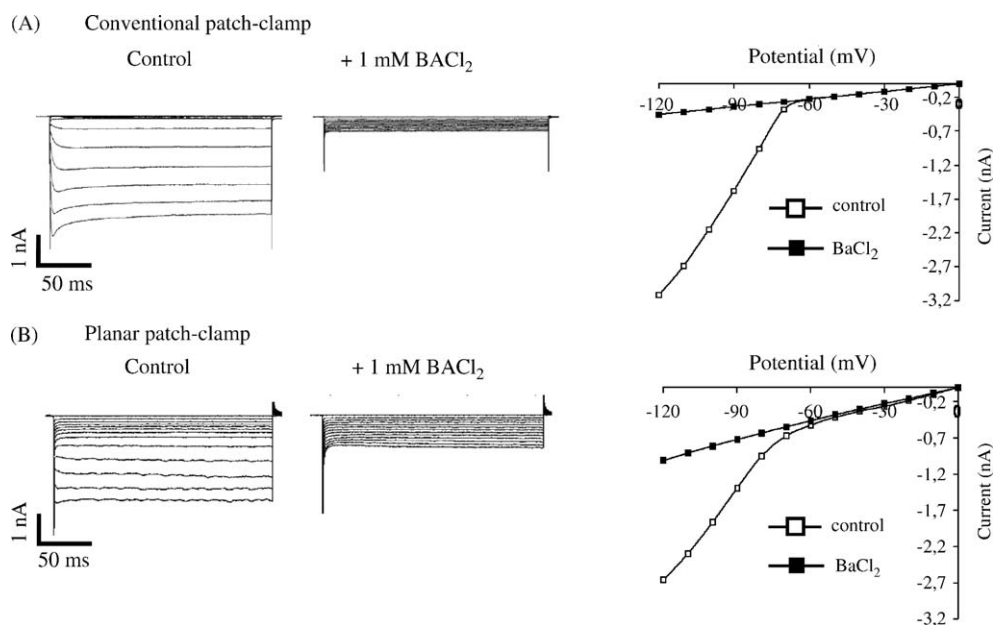


Fig. 5. Whole cell K^+ currents recorded from IRK1 channels with the chip device. Current recordings were performed in the whole-cell configuration from CHO cells expressing IRK1 channels. Inward rectifying potassium currents elicited with activating voltage steps from 0 to -120 mV with 10 mV decrements with conventional patch-clamp (A) and with planar patch-clamp (B). Seal resistance was $1\text{ G}\Omega$ in conventional patch-clamp and $\sim 100\text{ M}\Omega$ in planar patch-clamp. In both cases, blocking effect is demonstrated on inward K^+ currents by the unspecific Ba^{2+} divalent (1 mM). The capacitive peaks are related to the planar structure of the silicon chip (B). Typical data are displayed without applying leak subtraction. Current–voltage relationship curves were obtained from previous current traces (no leak compensation).

magnitude normalized for cell size as a function of the duration of Tet incubation. Both data with planar and pipette patch-clamp agreed for both short and long incubation times.

4. Discussion

Potassium channels, including both Ca^{2+} -activated and inward rectifying K^+ channels, are the major class of ion channels involved in the generation of membrane potentials. The ability to control and regulate the resting membrane potential is due to an unusual conduction feature, which is now commonly referred to as inward and outward rectification. Such a definite electrical signature, perfectly characterized by conventional patch-clamp techniques, makes BK(Ca) and IRK channels attractive models for the validation of new planar patch-clamp chips. Large conductance calcium- and voltage-activated K^+ channels are also referred to as “maxi- K ” channels because of their high single-

channel conductance ($250\text{--}300\text{ pS}$), eliciting a large membrane current. The activation of BK channels leads to a small increase in extracellular K^+ which shifts the reversal potential for K^+ towards a more positive value (Nilius and Droogmans, 2001). This leads to the activation of an IRK1 conductance of $23\text{--}30\text{ pS}$, which is weaker than that of BK channels. In addition, both voltage-gated ion channels are targets for known drugs or divalent ions as well as potential targets for new biosensor approaches (Straub et al., 2001). For these reasons, efforts are concentrated on understanding the properties of K^+ channels as well as identifying new antagonists or activators (Busse et al., 1993, Nilius and Droogmans, 2001).

We have focused on optimizing the coupling of the cells to planar chips in order to be able to record resolved BK and IRK1 currents. We recorded ionic currents from BK(Ca) channels expressed in HEK-293 cells, as well as currents from IRK1 channels expressed in CHO cells, with known values of 250 and 30 pS , respectively. Current traces and current–voltage

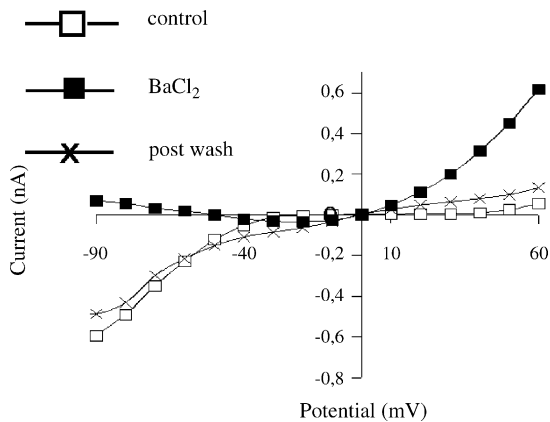


Fig. 6. Activation of endogenous cationic channels with the chip device. Activation of endogenous cationic channels by 10 mM BaCl_2 with activating voltage steps from 0 to +60 mV ($P/4$ leak subtraction was displayed). Inward rectifying K^+ currents were elicited by a voltage pulse from +60 to -90 mV (\square) and were inhibited in the presence of 10 mM BaCl_2 (\blacksquare). The part of the curve (\blacksquare) at positive potentials shows the activation of endogenous cationic channels by 10 mM BaCl_2 . The I - V curve (\times) was plotted after blocker washout and shows the reversible effect of BaCl_2 . $P/4$ leak subtraction is displayed.

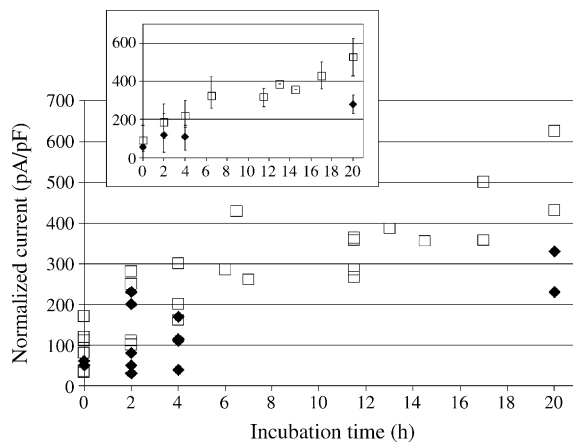


Fig. 7. Time-dependent increase in BK(Ca) channel expression with tetracycline incubation. Currents were recorded from CHO cells stably expressing the BK(Ca) channel in conventional patch-clamp (\blacklozenge) and in planar patch-clamp (\square). Whole-cell current magnitude, evoked by depolarization to 120 mV, is plotted as a function of the duration of Tet incubation, starting at time 0. Current was normalized for cell size, i.e., for cell membrane capacitance. Each displayed point corresponds to one assay on one cell. The inset illustrates the mean current values (\pm S.E.M.) at selected times.

curves were similar to those obtained using conventional patch-clamp (Fig. 5). We noted that cell heterogeneity, even in stable cell lines, could induce a slight variation in current density from patch-to-patch. The slight difference that was observed between conventional and planar patch-clamp data may be also due to the seal resistance value and therefore to the current leak.

The performance of our device for the detection of drug-induced modifications of ion channel functions were examined using a specific blocker of the BK channels, iberiotoxin, as well as Ba^{2+} , a divalent cation which is known to inhibit IRK1 currents. The onset and offset of the reversible Ba^{2+} block demonstrated the capacity of our device to introduce and remove compounds within seconds. In addition, Ba^{2+} is not only known to inhibit inward rectifying IRK1 currents but also to permeate through endogenous cationic channels at positive potentials. However, this effect was not observed at a concentration of 1 mM, as was previously described in the literature (Skryma et al., 1994). With our device, Ba^{2+} permeation could only be observed at concentrations equal to or greater than 10 mM.

With these stable lines, expression level was not controlled and was often too high, that makes it therefore impossible to obtain the desired range of current (single-channel or macroscopic currents). Therefore, to perform relevant validation steps on this new device, we analysed cell lines with channel expression under the control of an inducible promoter and demonstrated that our device is well suited for time-dependent graduated current densities and therefore macroscopic current recordings. Moreover, this system increased productivity by increasing the sealing success rate.

It is generally accepted that the seal resistance value, the substrate surface state and the substrate (chip or pipette) capacitance are critical parameters in patch-clamp experiments. We demonstrated that a $150 \text{ M}\Omega$ resistance seal, a $\sim 20 \text{ \AA}$ surface roughness and a 54 pF chip capacitance allowed ionic currents to be recorded in the whole-cell mode, thus allowing the pharmacological characterization of BK(Ca) and IRK1 channels.

4.1. Improving the frequency and quality of membrane sealing

Our experiments have shown that PECVD SiO_2 passivation leads to $155 \text{ M}\Omega$ to $7 \text{ G}\Omega$ seal resistances.

Initially, we hypothesized that the reduction of aperture diameters from 2.5 to 1.7 μm , a value recently reported to be optimal for such applications (Pantoja et al., 2004), favoured the sealing process. However, similar results could not be obtained in experiments involving microstructured chips using a mask of 1.7 μm diameter apertures (data not shown). This clearly indicates that aperture diameter is not the only factor which determines seal quality. Seal quality also depends on the length of membrane invagination in the microhole and the total contact surface. The optimal range of 1–2 μm holes should be a compromise between the surface offered by the microhole to the cell membrane and the elasticity of the cell membrane during aspiration. We assumed that PECVD SiO_2 deposition leads to larger sidewalls and/or smoother angles of the microhole providing a better contact area for seal formation (Sigworth and Klemic, 2002). The “hourglass” shape of the aperture, demonstrated by SEM observations, and the microhole resistance value, seem to favour the formation and the quality of the required seal. Rough edges were previously reported to prevent adequate seal formation, leading the authors to claim that great care should be taken to obtain a clean and smooth surface around the microhole (Sigworth and Klemic, 2002, Corey and Stevens, 1983). For many, this apparently favours a good contact with a gap of only a few \AA between the cell membrane and the substrate (Corey and Stevens, 1983; Sakmann and Neher, 1984). While qualitative considerations have been advanced as “seal rules” or “seal recipes”, no scale or roughness values have been reported in most studies. However, our experiments showed that, despite the roughness caused by the PECVD SiO_2 layer the seal values were actually higher than those obtained on smooth, thermal SiO_2 . It can therefore be assumed that the PECVD coating has a positive influence on the resistance value by increasing the contact area between the cell membrane and the substrate or that the sole physico-chemical properties of the SiO_2 -coated surface improves seal quality. In the PECVD process, it is known that temperature and pressure have a major influence on layer composition and density. The growth rate also influences the quality of the layer. Future investigations will therefore focus on determining the optimal degree of roughness so as to increase chip performance above the current $\sim 20\%$ success rate.

Compared to traditional patch-clamp and to glass-made planar chips, our lower seal electrical resistance restricts our applications to cell lines with high surface expression of functional ion channels. Nevertheless, this makes the S/N ratio acceptable to allow the use of such a loose patch-clamp in the cell type studied. We report here a set of data on standard cell models and also on an original BK-inducible model that demonstrate the advantages of a PECVD coating. This treatment remains to be optimized but is promising for chip improvement. This optimization represents a real challenge for further “smart chips” design with many integrated functions.

4.2. Device performances

Silicon introduces a capacitance due to the free charge carrier density of silicon (Fertig et al., 2003). This inherent high capacitance is the main drawback of silicon chips since electrical noise increases with capacitance (Wonderlin et al., 1990). The chips under investigation were initially coated with 2.12 μm thermal SiO_2 but the capacitance of 75 pF was too high to allow high-resolution current recordings. The addition of an insulating layer of 1.5 μm SiO_2 PECVD reduced the chip capacitance from 75 to 54 pF. This value is in the range of those found in the literature for silicon-based devices (50 pF in (Schroeder et al., 2003), 35 pF in (Schmidt et al., 2000)). While our current chip capacitance allowed to resolve the electrophysiological signatures of channels, we are striving to reduce device capacitance below the cell capacitance (10–100 pF) so that the cell membrane remains the dominant noise factor (Matthews and Judy, 2003). In a near future, we expect that capacitance could be reduced to less than 10 pF by reducing the fluid contact surface and/or increasing the insulator layer. Since our membrane is SiO_2 -made, our microfabrication process allows the design of a thicker SiO_2 membrane (10 μm instead of the current 2 μm), a feature more difficult to obtain with silicon bulk-made membranes (Pantoja et al., 2004).

The ability of a patch-clamp device to allow rapid and robust solution exchange with low sample solution consumption is one of the prerequisites for drug screening and ligand-gated channel analysis. The system under investigation allows the handling of small volumes in analysis chambers of 4 μl and is therefore

suitable for drug screening applications, as demonstrated by the block of BK(Ca) channels with 20 μl of 100 nM iberitoxin circulating in the microfluidic capillaries. In contrast, traditional patch-clamp recordings usually require much larger volumes. Further optimizations are underway to decrease the compound volume to below 10 μl .

While the frequency of high gigaohm seals is still low and has to be further optimized, we have progressed dramatically in seal success rate by altering surface roughness, modifying the size, shape and diameter of the microhole. The current model is a building block towards a systematic study of the major parameters influencing seal quality. The exploitation of such a set of experiments should bring significant results and improve further our seal success rate. Once chip coating conditions are optimized, the lower current levels achieved with Tet-free media with the inducible model will be ideal for reliable recording of single-channel currents. Moreover, the versatility of silicon technology should permit the development of a state-of-the-art device integrating on-chip electronics and microfluidics.

Acknowledgment

We would like to thank Chris Lingle for providing the BK cDNA.

References

- Asmild, M., Oswald, N., Krzywkowski, K.M., Friis, S., Jacobsen, R.B., Reuter, D., Taboryski, R., Kutchinsky, J., Vestergaard, R.K., Schroder, R.L., et al., 2003. Upscaling and automation of electrophysiology: toward high throughput screening in ion channel drug discovery. *Receptors Channels* 9, 49–58.
- Bruggemann, A., George, M., Klau, M., Beckler, M., Steindl, J., Behrends, J.C., Fertig, N., 2003. High quality ion channel analysis on a chip with the NPC technology. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 665–673.
- Busse, R., Mülsch, A., Fleming, I., 1993. Mechanisms of nitric oxide release from vascular endothelium. *Circulation* 87, 18–25.
- Cheung, K.C., Kubow, T., Lee, L.P., 2002. Individually addressable planar patch clamp array. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*
- Corey, D.P., Stevens, C.F., 1983. Science and technology of patch-recording electrodes. In: Sakmann, B., Neher, E. (Eds.), *Single-Channel Recording*. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 53–68.
- Fertig, N., Blick, R.H., Behrends, J.C., 2002. Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip. *Biophys. J.* 82, 3056–3062.
- Fertig, N., George, M., Klau, M., Meyer, C., Tilke, A., Sobotta, C., Blick, R.H., Behrends, J.C., 2003. Microstructured apertures in planar glass substrates for ion channel research. *Receptors Channels* 9, 29–40.
- Klemic, K.G., Klemic, J.F., Sigworth, F.J., 2005. An air-molding technique for fabricating PDMS planar patch-clamp electrodes. *Pflug. Arch.* 449, 564–572.
- Kosar, T.F., Stucky, N.L., Chen, C., Kim, K.J., Folch, A., 2003. Nanohole arrays for parallel patch-clamping and focal delivery of biochemical factors to cells. *Proc. Micro Total Anal. Syst.*, 25–28.
- Kutchinsky, J., Friis, S., Asmild, M., Taboryski, R., Pedersen, S., Vestergaard, R.K., Jacobsen, R.B., Krzywkowski, K., Schroder, R.L., Ljungstrom, T., et al., 2003. Characterization of potassium channel modulators with QPatch automated patch-clamp technology: system characteristics and performance. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 685–693.
- Lehnert, T., Netzer, R., Bischoff, U., Gijss, M.A.M., 2002. SiO₂ nozzle array-based patch-clamp microsystem. *Proc. Micro Total Anal. Syst.* 1, 28–30.
- Matthews, B., Judy, J.W., 2003. Characterization of a micromachined planar patch-clamp for cellular electrophysiology. In: *Proceedings of the IEEE-EMBS International Conference on Neural Engineering*, pp. 648–651.
- Mc Dowell, M., Gray, E., 2004. An optimal cell detection technique for automated patch clamping. *NASA/TM*, pp. 1–8.
- Nilius, B., Droogmans, G., 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 81, 1415–1459.
- Owen, D., Silverthorne, A., 2002. Channeling drug discovery, current trends in ion channel discovery research. *Drug Discov. World* 3, 48–61.
- Pandey, S., Mehrotra, R., Wykosky, S., White, M.H., 2004. Characterization of a MEMS BioChip for planar patch-clamp recording. *Solid-State Electron.* 48, 2061–2066.
- Pantoja, R., Nagarah, J.M., Starace, D.M., Melosh, N.A., Blunck, R., Bezanilla, F., Heath, J.R., 2004. Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics. *Biosens. Bioelectron.* 20, 509–517.
- Picollet-D'Hahan, N., Sordel, T., Garnier-Raveaud, S., Sauter, F., Ricoul, F., Pudda, C., Marcel, F., Chatelain, F., 2004. A silicon-based “multi-patch” device for ion channel current sensing. *Sensor Lett.* 2, 91–94.
- Sakmann, B., Neher, E., 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu. Rev. Physiol.* 46, 455–472.
- Schmidt, C., Mayer, M., Vogel, H., 2000. A chip-based biosensor for the functional analysis of single ion channels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 3137–3140.
- Schroeder, K., Neagle, B., Trezise, D.J., Worley, J., 2003. Ionworks HT: a new high-throughput electrophysiology measurement platform. *J. Biomol. Screen.* 8, 50–64.
- Seo, J., Ionescu-Zanetti, C., Diamond, J., Lal, R., Lee, L.P., 2004. Integrated multiple patch-clamp array chip via lateral cell trapping junctions. *Appl. Phys. Lett.* 84, 1973–1975.

- Sigworth, F.J., Klemic, K.G., 2002. Patch clamp on a chip. *Biophys. J.* 82, 2831–2832.
- Skryma, R., Prevarskaya, N., Vacher, P., Dufy, B., 1994. Voltage-dependent Ca^{2+} channels in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *FEBS Lett.* 349, 289–294.
- Stett, A., Bucher, V., Burkhardt, C., Weber, U., Nisch, W., 2003a. Patch-clamping of primary cardiac cells with micro-openings in polyimide films. *Med. Biol. Eng. Comput.* 41, 233–240.
- Stett, A., Burkhardt, C., Weber, U., van Stiphout, P., Knott, T., 2003b. CYTOCENTERING: a novel technique enabling automated cell-by-cell patch clamping with the CYTOPATCH chip. *Receptors Channels* 9, 59–66.
- Straub, B., Meyer, E., Fromherz, P., 2001. Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of iono-electronic interfacing. *Nat. Biotechnol.* 19, 121–124.
- Tao, H., Santa Ana, D., Guia, A., Huang, M., Ligutti, J., Walker, G., Sithipong, K., Chan, F., Guoliang, T., Zozulya, Z., Saya, S., Phimmachack, R., Sie, C., Yuang, J., Wu, L., Xu, J., Ghetti, A., 2004. Automated tight seal electrophysiology for assessing the potential hERG liability of pharmaceutical compounds. *Assay Drug Dev. Technol.* 2 (5), 497–506.
- Terstappen, G.C., 2005. Ion channel screening technologies today. *Drug Discov. Today: Technol.* 2, 133–140.
- Trapani, J.G., Korn, S.J., 2003. Control of ion channel expression for patch clamp recordings using an inducible expression system in mammalian cell lines. *BMC Neurosci.* 4, 15.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
- Wang, X., Li, M., 2003. Automated electrophysiology: high throughput of art. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 695–708.
- Wonderlin, W.F., French, R.J., Arispe, N.J., 1990. Recording and analysis of currents from single ion channels. In: Boulton, A.A., Baker, G.B., Vanderwolf, C.H. (Eds.), *Neuromethods: Neurophysiological Techniques: Basic Methods and Concepts*, vol. 14. The Humana Press Inc., Clifton, pp. 35–142.
- Wood, C., Williams, C., Waldron, G.J., 2004. Patch clamping by numbers. *Drug Discov. Today* 9, 434–441.
- Xu, J., Chen, Y., Li, M., 2004. High-throughput technologies for studying potassium channels-progresses and challenges. *Drug Discov. Today* 3, 32–38.
- Xu, J., Guia, A., Rothwarf, D., Huang, M., Sithipong, K., Ouang, J., Tao, G., Wang, X., Wu, L., 2003. A benchmark study with sealchip planar patch-clamp technology. *Assay Drug Dev. Technol.* 1, 675–684.

Annexe 6: « Influence of glass and polymer coatings on CHO cell morphology and adhesion », T. Sordel, F. Kermarec-Marcel, S. Garnier-Raveaud, N. Glade, F. Sauter-Starace, C. Pudda, M. Borella, M. Plissonnier, F. Chatelain, F. Bruckert, N. Picollet-D'hahan. *Biomaterials*, Vol. 28, p 1572-1584, 2006.

Influence of glass and polymer coatings on CHO cell morphology and adhesion

Thomas Sordel^{a,1}, Frederique Kermarec-Marcel^{a,1}, Stephanie Garnier-Raveaud^a,
Nicolas Glade^b, Fabien Sauter-Starace^b, Catherine Pudda^b, Mathias Borella^c,
Marc Plissonnier^c, Francois Chatelain^a, Franz Bruckert^d, Nathalie Picollet-D'hahan^{a,*}

^aBioChip Laboratory—CEA, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

^bLETI-CEA Grenoble, France

^cLITEN-CEA Grenoble, France

^dBBSI Laboratory—CEA Grenoble, France & ENSPG/LMPG Grenoble, France

Received 7 July 2006; accepted 30 October 2006

Available online 30 November 2006

Abstract

Successful development of cell-on-chip microsystems where living cells are deposited and grown in microfabricated structures is highly dependent on the control of cell/substrate interactions. In this study, several materials of interest were tested for CHO cell growth and morphology: (i) glass, fibronectin-, poly-L-lysine- and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)—treated glass and UV/O₃-modified PDMS coating on glass as well as (ii) silicon, poly-L-lysine-, APTES-, O₂ plasma-treated and oxide-coated silicon. In addition, we quantitatively characterized cell adhesion to these substrates using a radial flow detachment assay. Lack of correlation between cell adhesion and cell morphology was systematically observed for all substrates. In particular, we show that PDMS coatings on glass can be finely tuned by UV/O₃ treatment to enhance cell adhesion and induce elongated morphology. Moreover, we observed a low shear stress cell detachment mechanism on silicon oxide coatings on silicon wafers. It is therefore possible with these coatings to selectively influence either cell adhesion or morphology.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cell adhesion; Cell morphology; Surface energy; Surface coatings; Biochips

1. Introduction

Adhesion of cells to a surface is crucial for a variety of cell functions such as proliferation or differentiation and is also of major importance in biomaterials, implantable sensors or microdevice development. Selective cell adhesion is often required in the development of devices dedicated to cell-on-chip-based applications. Some reports have investigated how nano-structuration [1,2], topographies [3,4] or chemical patterning of surfaces [5] can influence cell adhesion and morphology. Some authors have also studied the control of cell–material interactions with bioactive

ligands such as peptides adsorbed or grafted to the surface [6,7]. These patterned substrates often require engineering approaches based on micro-patterning technology, photolithography or chemical coupling. Moreover, while most of these studies are mainly investigated on standard glass slides, some authors have studied silicate or silicon interfaces between cell and chip for bioelectronics devices [8,9] or microtextured silicon wafers for implantable sensors [10]. In the field of cell-on-chip devices, silicon is the standard material in microelectronics and appears as an emerging and promising material for cellular multi-parametric analysis and for bioelectronics-based sensing devices [11,12].

Eukaryote cells of high organisms interact with materials in a complex manner. Cell binding usually requires secretion of extracellular matrix (ECM) molecules that

*Corresponding author. Fax: +33 438785917.

E-mail address: picolletdhahan@dsvsud.cea.fr (N. Picollet-D'hahan).

¹These authors contributed equally to this work.

adsorb onto the surface. Moreover, expression of specific adhesion molecules allows firm cell adhesion and spreading onto the immobilized ECM molecules [13]. Spreading also involves surface-triggered remodeling of the cell cytoskeleton [14,15]. In this process, supramolecular complexes assemble at adhesion sites, called ‘focal contacts’. These dynamic structures form around transmembrane protein clusters, such as integrins, which bind to ECM molecules on one side, and to bundles of actin filaments called stress fibers on the other side [16–19]. As a result, cells exert forces on substrates and react to them, as a function of material elasticity [20,21]. This often gives a particular morphology to cultured cells. Signaling through cell adhesion and binding of extracellular factors in turn control gene expression, which modifies the cell itself. Cell adhesion is therefore often a prerequisite for cell division or differentiation.

Quantitative measurements of cell–substrate adhesion are difficult because this process involves the collective behavior of individual proteins confined in two-dimensional membrane geometry. Therefore, measuring cell–substrate adhesion is inseparable from modeling the geometry of the contact zone. Experimentally, applying external forces onto cells is required to obtain quantitative information on adhesion strength. Hydrodynamic forces have the advantage that comparable forces to adhesion can be applied simultaneously onto a very large number of cells, obviating the shape and statistical problems. The relative value of these forces is also easily controlled by changing the flow rate. We previously used hydrodynamic shear flow to probe the force needed to detach living cells from a substrate [22]. A critical detachment shear stress could be defined, $\sigma_{50\%}$, at which 50% of the cells detach under long-term application of mechanical constraint. A new peeling model was developed in this context, that explains how the mechanical energy associated with the work of the applied forces is dissipated within the cellular structure, creating deformation, and at the cell–surface interface, allowing disruption of the cell–substrate contacts [23]. In this frame, detachment kinetics was shown to depend on the applied shear stress and on biochemical and geometrical parameters independent of the substrate under study. Therefore, it is possible to use the critical shear stress to compare different substrates.

In this study, we explore the role of the ECM secreted by the cells on their adhesion and morphology properties. Chinese Hamster ovary (CHO) cells were used as a model as they show characteristic morphology and size. Adhesion was quantified with a radial flow detachment assay [22,24]. The main change compared to previous experiments consisted in the longer time during which cells were put in contact with the substrates, a time necessary for the cells to secrete ECM molecules onto which they adhered. The interest of radial flow chambers is that detachment is simultaneously probed at various shear stresses, since applied shear stress decreases as the inverse of the distance to the origin of the flow [25]. Therefore, measuring the

percentage of detached cells as a function of the distance to the origin of the flow allows the determination of $\sigma_{50\%}$ in a single experiment.

Here, we report a large scale study of the impact of glass and silicon coated with various materials on cell adhesion and morphology. We show that the radial flow technique coupled to cell microscopy is powerful to discriminate substrates that independently influence cell adhesion and cell morphology. Uniform surface coatings were preferred to more tedious engineering approaches using selective patterning. The selected coatings were chosen among those compatible with 3D surface functionalization of biochips.

2. Materials and methods

2.1. Substrate preparation

Glass substrates (glass slides provided from Menzel-glaser, Braunschweig, Germany) were cleaned with 3.6 M NaOH in H₂O/EtOH 95% (v/v) solution for 15 min before treating the surfaces with either poly-L-lysine (Sigma P8920, 0.1% (w/v) in water), fibronectin (Fn) (Sigma F1141, 1 mg/ml) or 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), Sigma A3648. 0.01% poly-L-lysine was added for 1 h under agitation and substrates were dried by centrifugation at 500 rpm for 5 min. Fn was deposited onto substrates at a concentration of 1 µg/ml for 15 min at room temperature, under agitation on a rotating table. APTES in acetone was used as the silanization agent. The substrate was immersed in a 1.2×10^{-3} mol/l APTES acetone/water solution (1:5 v/v, pH = 3.5 with addition of concentrated HCl) for 10 min, washed with distilled water and allowed to air-dry before use. Since substrates were used immediately, a post-activation with KOH was not needed. All products were purchased from Sigma.

Before poly-dimethylsiloxane (PDMS) deposition, glass substrates were rinsed with ethanol and distilled water, and dried under nitrogen flow. Surfaces were then cleaned in an O₂/Ar plasma. Radio-frequency (13.56 MHz) plasma deposition of a PDMS-like thin layer (around 100 nm) was performed on glass substrates by plasma enhanced chemical vapor deposition (PECVD) using octamethylcyclotetrasiloxane as chemical precursor and helium as carrier gas. After deposition of the polymer, UV/O₃ treatment was performed on PDMS-coated samples during 3, 5, 7 or 10 min using a UV/O₃ cleaner (JetLight, Irvine, USA). This treatment renders the surface hydrophilic instead of hydrophobic by oxidizing Si-CH₃ groups [26].

Si (100) silicon wafers (MEMC or ShinEtsu, Japan) were used as substrates (namely chips) and were modified by various treatments. Three types of chips were prepared using LETI clean room facilities and were studied: (i) chips coated with a SiO₂ layer grown by thermal oxidation (thermal SiO₂), (ii) chips activated by an additional O₂ plasma treatment and (iii) chips coated with an additional SiO₂ layer on the upper side. For this latter SiO₂ coating, two deposition strategies were performed. On one hand, low pressure chemical vapour deposition (LPCVD) resulted into a very uniform and homogeneous deposition with excellent purity. The precursors used were either tetra ethyl ortho silicate (TEOS) or high temperature oxide dichloro silane (HTO DCS). Chemical reactions for HTO oxide and for TEOS are, respectively: $\text{SiH}_2\text{Cl}_2(\text{g}) + 2\text{N}_2\text{O}(\text{g}) \rightarrow \text{SiO}_2(\text{s}) + 2\text{N}_2(\text{g}) + 2\text{HCl}(\text{g})$ and $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4(\text{l}) + \text{O}_2(\text{g}) \rightarrow \text{SiO}_2(\text{s}) + 11/3\text{C}_2\text{H}_4(\text{g}) + 2/3\text{CO}_2(\text{g}) + 8/3\text{H}_2\text{O}(\text{g})$ as compared to the reaction with thermal SiO₂: $\text{Si}(\text{s}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{g}) \rightarrow \text{SiO}_2(\text{s}) + 2\text{H}_2(\text{g})$. On the other hand, PECVD, was obtained by inducing plasma to the reactant gas (SiH₄) so as to enhance the chemical reaction on the surface of the wafers. PECVD was deposited at 300 °C with a rate of 1300 Å/min. LPCVD and PECVD processes resulted in a 1 µm thick SiO₂ layer.

Finally, before use, all silicon substrates received a final O₂ plasma treatment performed at 2.45 GHz, with a power of $P = 600$ W during 45 s using a Plassys equipment to make the surfaces hydrophilic. Chips were then stored in distilled water so as to preserve the hydrophilic character.

2.2. Surface characterizations

2.2.1. Drop angle and surface energy measurements

Contact angles were measured on solid substrates at room temperature using the sessile drop method on the drop shape analysis system G10/DSA10 (Krüss, Germany) with three different liquids (di-iodomethane, ethylene glycol and water). The average values of contact angles were determined from at least 4 droplets of each liquid. The three surface energy fractions (disperse fraction, electrostatic fraction and hydrogen bridges) of the substrates were determined using the extended Fowkes method [27].

2.2.2. Roughness determination

Atomic force microscopy (AFM) experiments were performed with a DimensionTM 3100 AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) and a Nanoscope IV controller (Digital Instruments) equipped with a large-range scanner (maximum XY scan range of $90\text{ }\mu\text{m} \times 90\text{ }\mu\text{m}$ with vertical Z range of $6\text{ }\mu\text{m}$). Measurements were obtained in the AFM tapping mode. The tips were supplied by Nanosensor (Reference NCH 50, $f_0 = 300\text{ kHz}$; $K = 40\text{ N/m}$). The cantilever was made of silicon with an aluminum coating. Dimensions of the cantilever were as follows: thickness = $4\text{ }\mu\text{m}$; length = $125\text{ }\mu\text{m}$; width = $35\text{ }\mu\text{m}$ and the tip was characterized by a height of $10\text{--}15\text{ }\mu\text{m}$, a tip radius of 10 nm and a half cone angle of less than 10° . All roughness values in this paper refer to the root-mean-square (rms) roughness of the height profile.

2.3. Cell growth and preparation

CHO cells (ATCC:CCL-61) were cultured in a “culture medium” which was a Dulbecco’s modified Eagle’s medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 1.2 mg/ml geneticin, 1% penicillin–streptomycin and 1% L-glutamine in flasks. Cells were pre-washed with phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen), detached with trypsin EDTA, and then resuspended in the culture medium at a concentration of 3×10^5 cells/ml.

To determine the doubling time, cells were plated on substrates at a concentration of 3×10^5 cells/ml and incubated at 37°C with 5% CO_2 . The doubling time (t_g) was calculated as follows:

$$t_g = \frac{(t - t_0) \times \ln 2}{\ln N - \ln N_0} \quad (1)$$

with N , the number of cells counted after 20 h (using AnalySIS[®] software). After 20 h of culture, the cell seeding density was determined around 10^3 cells per unit area i.e., knowing that a unit area equals 0.0236 cm^2 , around 38×10^3 cells/ cm^2 , N_0 , the initial number of cells from the inoculum, determined in 11 ml-petri dishes (78.5 cm^2). The glass slide ($76\text{ mm} \times 26\text{ mm}$) was placed in this Petri dish, filled with 11 ml culture medium. (This represents around 3×10^6 cells in this volume, i.e., 3×10^5 cells/ml), $t - t_0$ the cell culture duration of 20 h.

For cell morphology visualization, cells were plated on substrates at a concentration of 3×10^5 cells/ml, allowed to adhere for 20 h and observed at $10\times$ and $20\times$ magnifications with a Provis microscope (Olympus) under transmission for glass-based substrates and under reflection for SiO_2 -type substrates. A length/width ratio ≥ 2 was significant enough to discriminate an elongated cell from a rounded cell.

2.4. Determination of critical shear stress for detachment

The radial flow detachment experimental set up was similar to the one used by Decave et al. [22]. All experiments were performed at $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. All glass and silicon substrates were cut at dimensions of $76\text{ mm} \times 26\text{ mm}$. Cells were plated on substrates at a concentration of 3×10^5 cells/ml in culture medium, pH = 7.4, and allowed to adhere for 20 h. Following the 20 h of culture, substrates with cells were placed in a specially manufactured holder, so that the surface of the substrate was at the same height than that of the holder. In this way, the same hydrodynamic flow of PBS (only used in our study as the radial flow to detach cells) could be applied to substrates of different thickness. The holder and the substrate

were then submerged by raising the level of PBS in the lower tank of the apparatus. A flat stainless steel disk (80 mm diameter) pierced in its center (1.5 mm orifice diameter) was placed above, taking care not to trap any bubble below. The distance, e , between the disk and the sample plate (around $200\text{--}300\text{ }\mu\text{m}$) was adjusted with precision screws. The central orifice of the disk was connected to an upper tank filled with PBS, and the fluid was allowed to flow by gravity. The fluid levels in the upper and lower tanks were maintained constant by two pumps, permitting a direct measurement of the flow rate (D , in the range of $50\text{--}100\text{ ml/min}$). The cells were thus submitted to a shear flow under a controlled laminar radial geometry. In this simple geometry, the hydrodynamic shear stress applied to the surface decreases inversely with the distance r to the origin of the flow according to

$$\sigma(r) = 3D\eta/\pi r e^2, \quad (2)$$

where η is the dynamic viscosity of the fluid. After 10 min, the disk was carefully removed, and the plate was transferred in a flat cuvette for microscopic examination of the remaining cell distribution.

The cell distribution remaining after an experiment was examined at intermediate magnification ($10\times$) under transmission or reflection illumination (AX70 Olympus microscope). A set of overlapping digital photographs was recorded, from the origin of the flow to 20 mm in opposite directions, using a controlled microscope stage (Multicontrol 2000 Märkzhauser). These captured images could be stored and analyzed later. To perform an analysis, a full picture was numerically reconstructed. When visible, the origin of the flow was detected by the presence of the stagnation point, a zone of low local stress where some cells were remaining. Otherwise, the origin of the flow was determined as the symmetry origin of the cell distribution. Cells were counted individually according to their contrast using the AnalySIS[®] software and were analyzed as a function of the distance to the center of the flow. The cell density was sampled using rectangular counting areas ($34 \times 1.4\text{ mm}^2$) placed side by side in the direction of the flow. Because of the symmetry of the setup, the same shear stress could be found at opposite positions from the orifice. Percentages of detached cells exposed to the same shear stress were thus averaged. The cell densities measured were compared to the initial cell density determined from the same plate just before exposition to the flow. The distance $r_{50\%}$ at which 50% of the cells were detached was determined. The critical shear stress for cell detachment, $\sigma_{50\%}$, was then calculated using Eq. (2) with $r = r_{50\%}$. At a given flow rate, the range of experimentally attainable shear stresses is determined by the size of the orifice (region of maximum stress) and the disk diameter (region of minimum stress).

3. Results

3.1. Glass and coated glass

NaOH-cleaned glass and APTES-treated glass are hydrophilic (water contact angle = 15°), with most of the surface energy originating from electrostatic interaction (Fig. 1A). Poly-L-lysine or Fn adsorption slightly decreases the hydrophilic feature (water contact angle = $40\text{--}50^\circ$), because of the hydrophobic part of these molecules. PDMS coating makes the surface fully hydrophobic (contact angle = 100°) by exposing CH_3 -groups at the surface. UV/ O_3 treatment partially oxidizes methyl groups of the PDMS polymer, which gradually increases the surface energy as a function of the duration of the treatment, resulting in a fully hydrophilic surface after 10 min (Fig. 1A). Under UV/ O_3 treatment, hydroxyl and carboxyl groups are formed, giving a negatively charged surface at physiological pH. These modifications occur not only at the surface but also in the bulk of the polymer, resulting

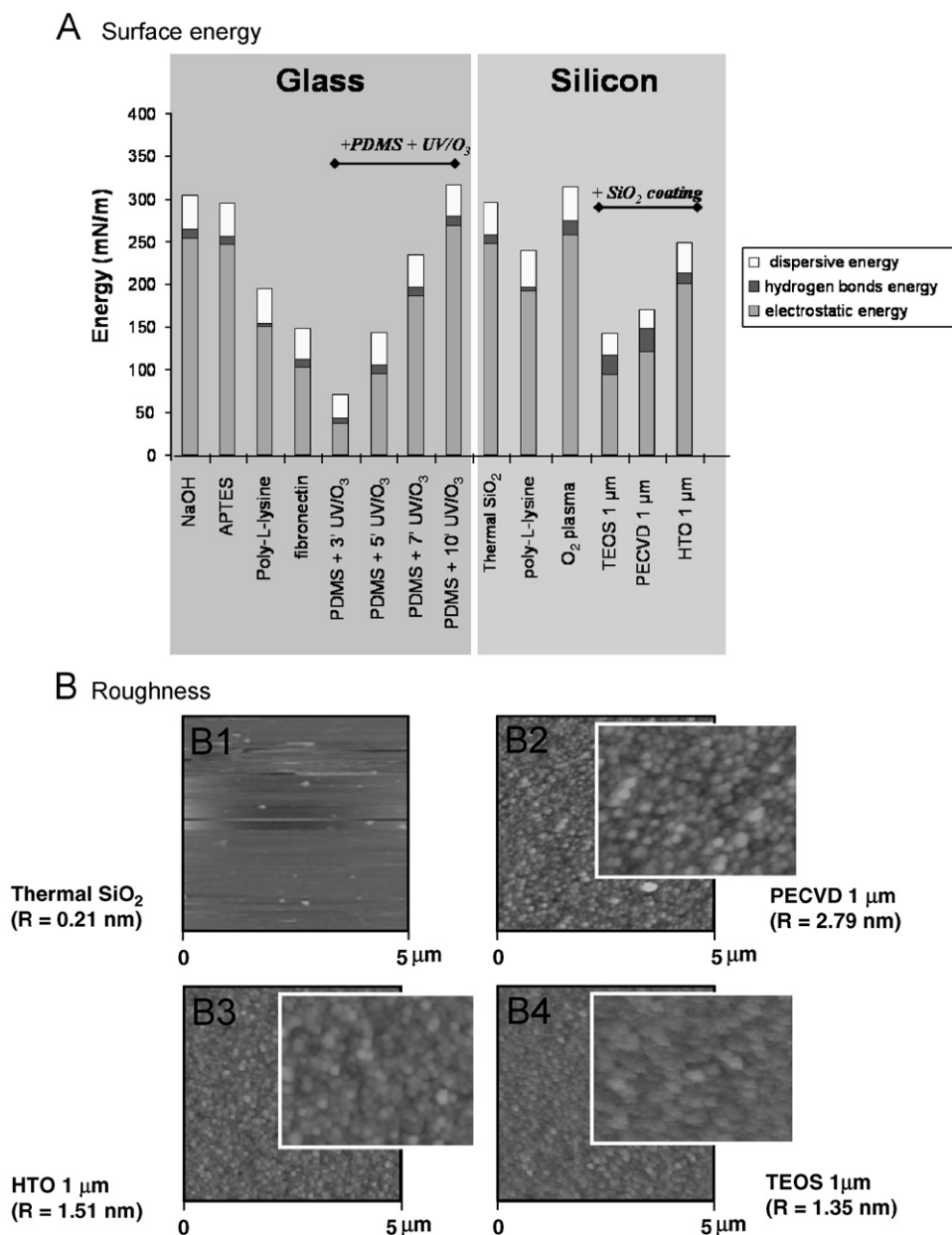


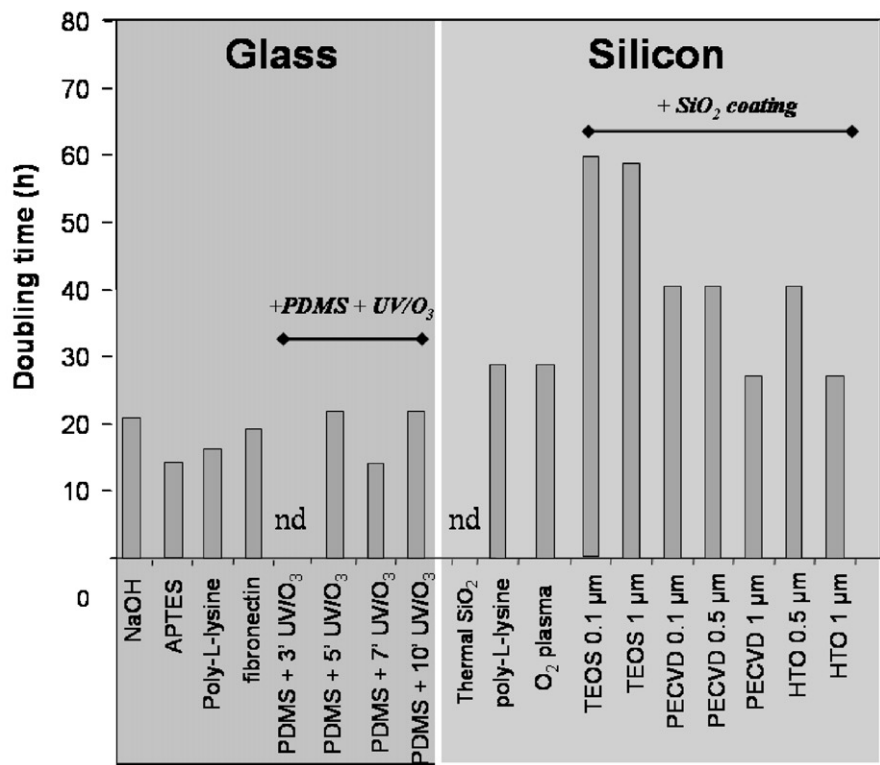
Fig. 1. Physico-chemical properties of treated glass and treated silicon surfaces: (A) Surface energy. Dispersive, electrostatic and hydrogen bonds fractions of the surface energy (mN/m) are displayed for different coatings on glass and silicon wafer. In total, 1 μm refers to the thickness of the PECVD or TEOS or HTO coating. The duration of UV/O₃ treatment of PDMS-coated substrates is indicated in minutes. (B) AFM images of (B1) thermal SiO₂ chips, (B2) 1 μm thick silicon oxide deposited by PECVD, (B3) 1 μm thick silicon oxide deposited by HTO and (B4) 1 μm thick silicon oxide deposited by TEOS. Image sizes are 5 μm \times 5 μm \times 50 nm with R_z (max) = 27.07 nm in B1, 23.43 nm in B2 and 12.91 nm in B3. Note that these AFM images are representative of images routinely obtained in the Biochip lab and Leti's lab.

in a deep stoichiometric change of the material [26] inferred from the observation that the hydrophilic feature of the surface persists for much longer times (days versus minutes) compared to a simple oxygen plasma treatment of PDMS [28]. The electrostatic energy increases continuously up to 10 min treatment, then stabilizes at around 300 mN/m (Fig. 1A). The dispersive and hydrogen bond energies slightly increase up to 5 min and then stabilize at 40 and 10 mN/m, respectively (Fig. 1A). Duration of the treatment was extended up to 30 min (data not shown) and results show that the surface energy

does not change significantly after 10 min of UV/O₃ treatment.

On all other glass-based substrates, CHO cells were able to adhere and grow with a doubling time of approximately 20 h (Fig. 2A). Microscopic examination of cells after 20 h showed that on glass, either bare or coated with poly-L-lysine or Fn, about half of the cells are elongated, indicating the presence of focal contacts and actin stress fibers (Fig. 3). On APTES-treated glass, a larger fraction of cells (~80%) was elongated (Fig. 3). When spread on PDMS-coated glass with minimal (less than 3 min) UV/O₃

A Doubling time



B Critical shear stress $\sigma_{50\%}$

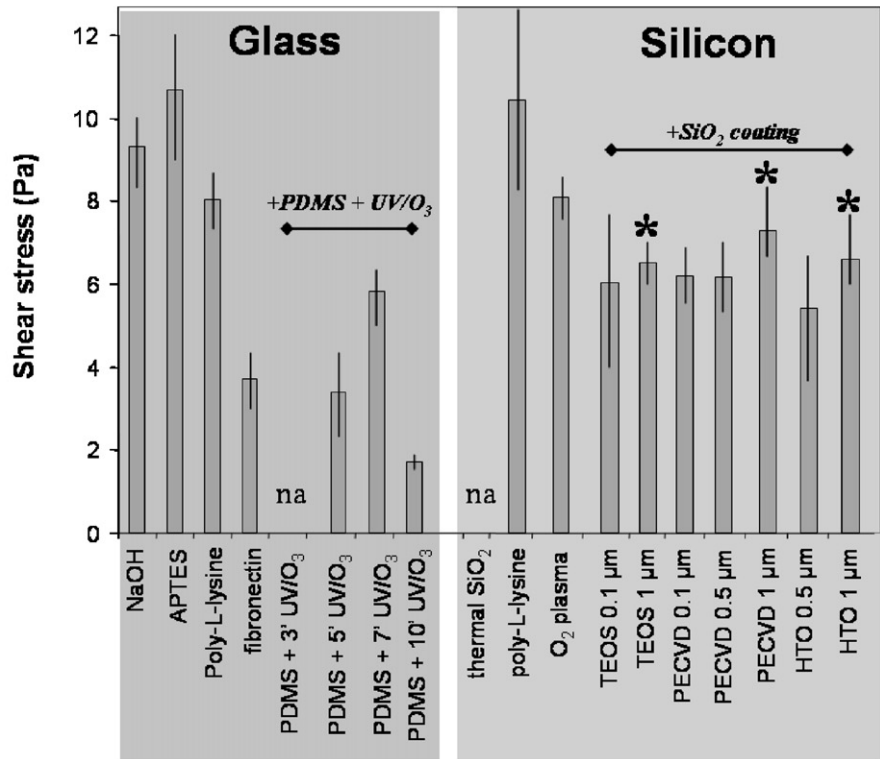


Fig. 2. Biocompatibility and adherence properties of treated glass and treated silicon surfaces with CHO cells. A. Cell doubling time (h) is determined as explained in Section 2. nd = not determined. B. Critical shear stress ($\sigma_{50\%}$) is expressed in Pa for the different substrates except when cells are non adherent (na). For structures where “shred detachment” occurs (see Fig. 6), the highest critical shear stress (individual cell detachment) is reported (*).

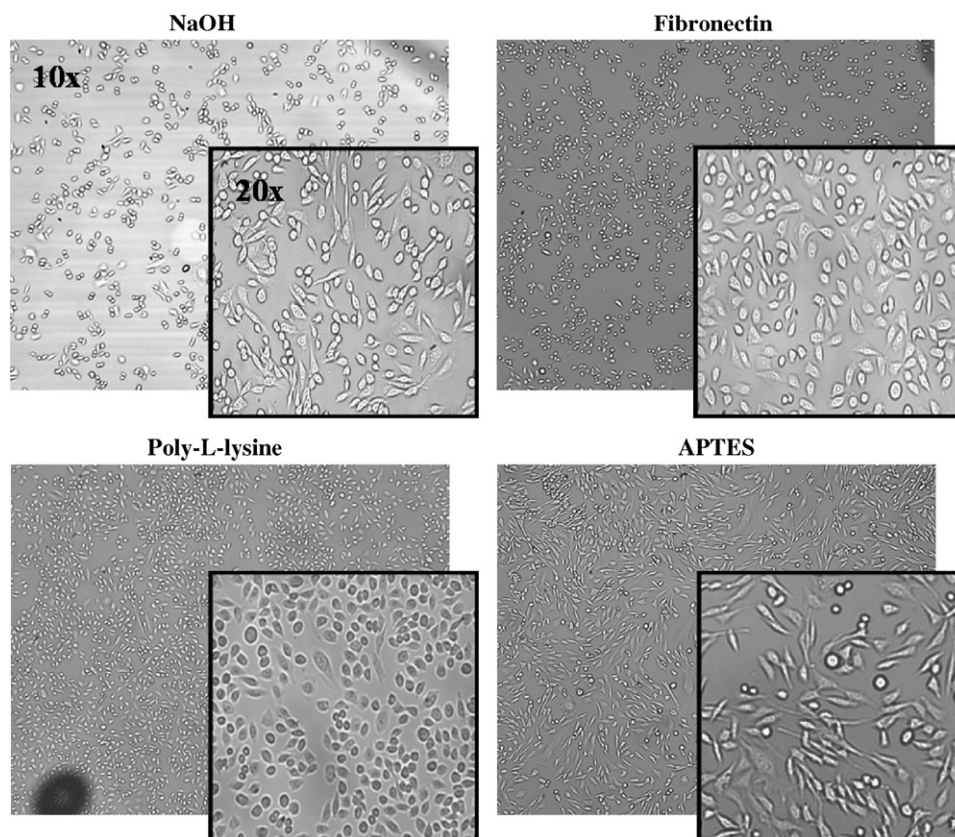


Fig. 3. Morphology of CHO cells grown on different coated-glass substrates. Enlarged views ($20\times$) are presented in the foreground of each photograph. The diameter of round cells is about $10\mu\text{m}$ and the length of elongated cells is about $30\mu\text{m}$.

treatment, cells did not grow and consistently exhibited a round morphology. On PDMS-coated glass with 5–10 min UV/ O_3 treatment, the morphology of cells significantly changed with the duration of post-treatment. After 5 min treatment, only a few cells were elongated, after 7 min, up to 30% of cells exhibited an elongated morphology and after 10 min, 20% were elongated (Fig. 4).

Cell adhesion was quantized by $\sigma_{50\%}$, the hydrodynamical shear stress able to detach 50% of the cells within 10 min. Cells did not adhere on glass when shear stress was applied only a few hours after deposition (data not shown). In contrast, they adhered well on bare glass after 20 h of culture in culture medium and a critical shear stress $\sigma_{50\%} \approx 9\text{ Pa}$ was required to detach them with a PBS fluid flow (Fig. 2B). APTES treatment slightly increased $\sigma_{50\%}$ while a poly-L-lysine coating and even more significantly an Fn coating decreased $\sigma_{50\%}$ (down to $\sim 4\text{ Pa}$ for Fn). UV/ O_3 treatment significantly increased cell adhesion to PDMS-coated substrates exhibiting a $\sigma_{50\%}$ of $\approx 3.5\text{ Pa}$ with a 5 min post-treatment, up to a maximum of $\approx 6\text{ Pa}$ with a 7 min post-treatment followed by a decrease to $\approx 2\text{ Pa}$ with a 10 min post-treatment (Fig. 2B).

3.2. Silicon, O_2 -activated silicon and SiO_2 coatings

Silicon with thermal SiO_2 was hydrophilic (contact angle = 20°) and a poly-L-lysine coating adsorption slightly

decreased its hydrophilic character (contact angle = 40°). Activation with oxygen plasma which creates OH groups on the silicate surface did not affect significantly the surface energy (Fig. 1A) while reducing the contact angle to 5° . A $1\mu\text{m}$ thick silicate deposition by processes such as PECVD, TEOS LPCVD or HTO LPCVD decreased the hydrophilic feature (water contact angle in the range $20\text{--}30^\circ$, see Fig. 1A).

Surface roughness was determined by AFM (Fig. 1B). The root mean square of the roughness was calculated for a $1\mu\text{m}^2$ wide area. The rms value was $0.21 \pm 0.10\text{ nm}$ on thermal SiO_2 surfaces, which is close to the values usually measured on polished silicon wafers with a native oxide [29]. Thermal SiO_2 surfaces were essentially flat, clean and homogeneous (Figs. 1B and B1). Oxygen plasma treatment did not affect this parameter (data not shown). In contrast, asperities and irregularities were present on both LPCVD and PECVD SiO_2 surfaces showing that silicon oxide deposition altered the surface topology, introducing asperities of approximately 25 nm in height (B2–B4). Between the asperities, the roughness was around $0.5\text{--}0.6\text{ nm rms}$ on $0.1\mu\text{m}$ PECVD SiO_2 surfaces (data not shown), 2.79 nm rms ($1\mu\text{m}$ PECVD; B2) and $1.3\text{--}1.5\text{ nm}$ (HTO or TEOS, respectively, B3 and B4) on thicker $1\mu\text{m}$ SiO_2 coatings. The observed differences are due to process experimental conditions (temperature, kinetics and thickness).

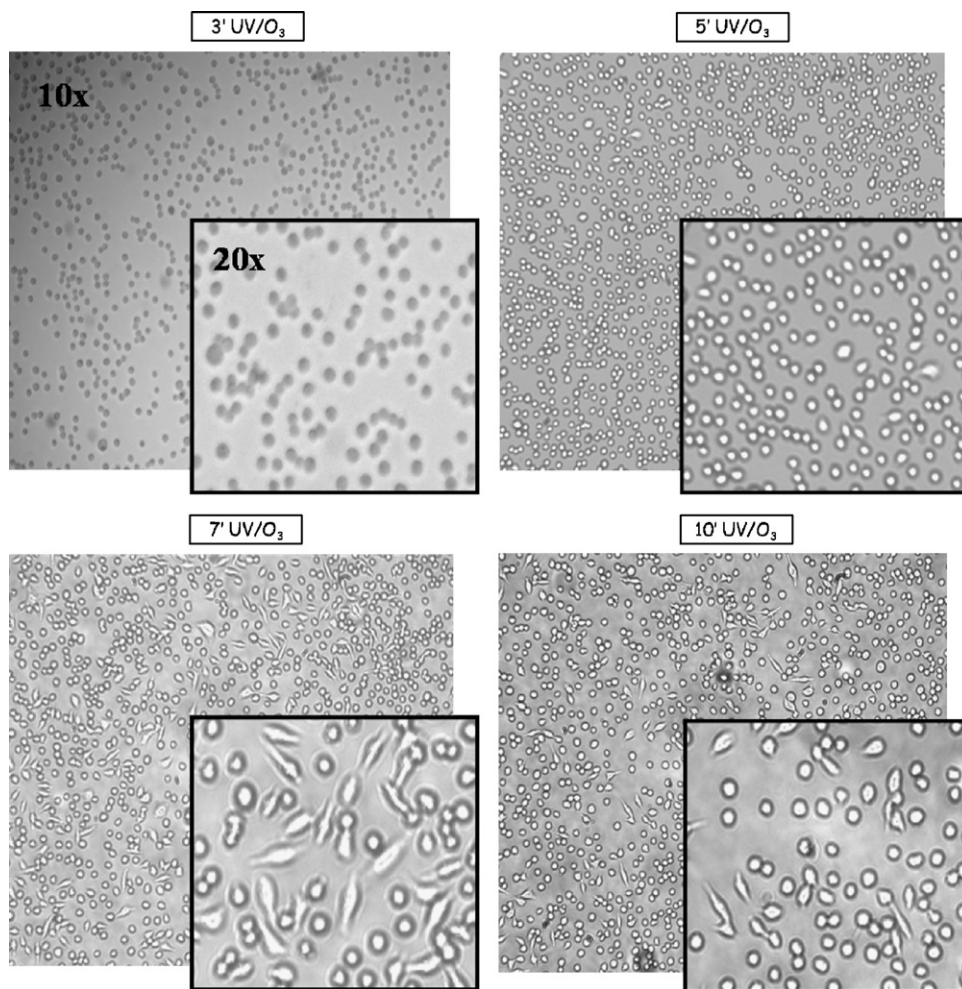


Fig. 4. Morphology of CHO cells grown on PDMS-coated glass substrates modified with UV/O₃. Four durations of activation were studied: 3, 5, 7 and 10 min. Enlarged views (20 ×) are represented at the foreground of each photograph.

CHO cells showed hampered growth on thermal SiO₂ slides (Fig. 2A). As a consequence, $\sigma_{50\%}$ could not be determined with the laminar flow method (Fig. 2B). A poly-L-lysine coating restored growth rate (Fig. 2A) but cells still presented a round morphology (data not shown). Oxygen plasma treatment also restored growth rate (Fig. 2A) but not the elongated morphology (Fig. 5A). Interestingly, a prolonged storage (20 days) of the oxygen plasma-treated samples in water was shown to induce an elongated morphology of CHO cells. This feature was not observed after 2 days and could be due to long-term chemical modifications of the surface when the substrate is stored in polar liquids [30]. Despite the round morphology observed at short times, both poly-L-lysine coating and O₂ plasma oxidation enhance adhesion to $\sigma_{50\%} \approx 10 \pm 2$ Pa and 8.5 ± 0.5 Pa, respectively (Fig. 2B). Deposition of 1 μ m thick silicate by TEOS did not improve cell growth (Fig. 2A). In contrast, deposition of 1 μ m thick silicate by PECVD or HTO fully restored cell growth. These coatings had differential influence on cell morphology with HTO and PECVD treatments increasing the percentage of

elongated cells to 10% and 30%, respectively, while cells remained round on TEOS treated slides (Fig. 5). Finally, silicate deposition by PECVD or LPCVD (TEOS and HTO) resulted in almost uniform critical shear stress ($\sigma_{50\%}$ ranging between 5 and 7 Pa).

Surprisingly, two critical detachment stresses could be defined on silicon wafers treated by silicon oxide deposition (Fig. 6). Around the stagnation point, a first detachment ring was observed for shear stresses above 8.1 Pa (Fig. 6A, $0.26 < R1 < 1.3$ mm). This corresponded to the usual pattern obtained after flow application on glass or O₂ plasma-treated silicon wafers. A second irregular ring appeared for shear stresses comprised between 2.4 and 4.3 Pa (Fig. 6A, $2.7 \text{ mm} < R2 < 5.5$ mm). This second ring was not homogenous, consisting of 0.2 mm (S1) to 2–3 mm (S2) large shreds. The shape of the largest shreds was complex (see asterisk in Fig. 6C), with a semi-circular group of cells remaining at the high stress side of the shreds (smaller r , see asterisk in Fig. 6C) and thin parallel detachment lines on the low stress side (larger r). The second ring was more apparent on samples processed by

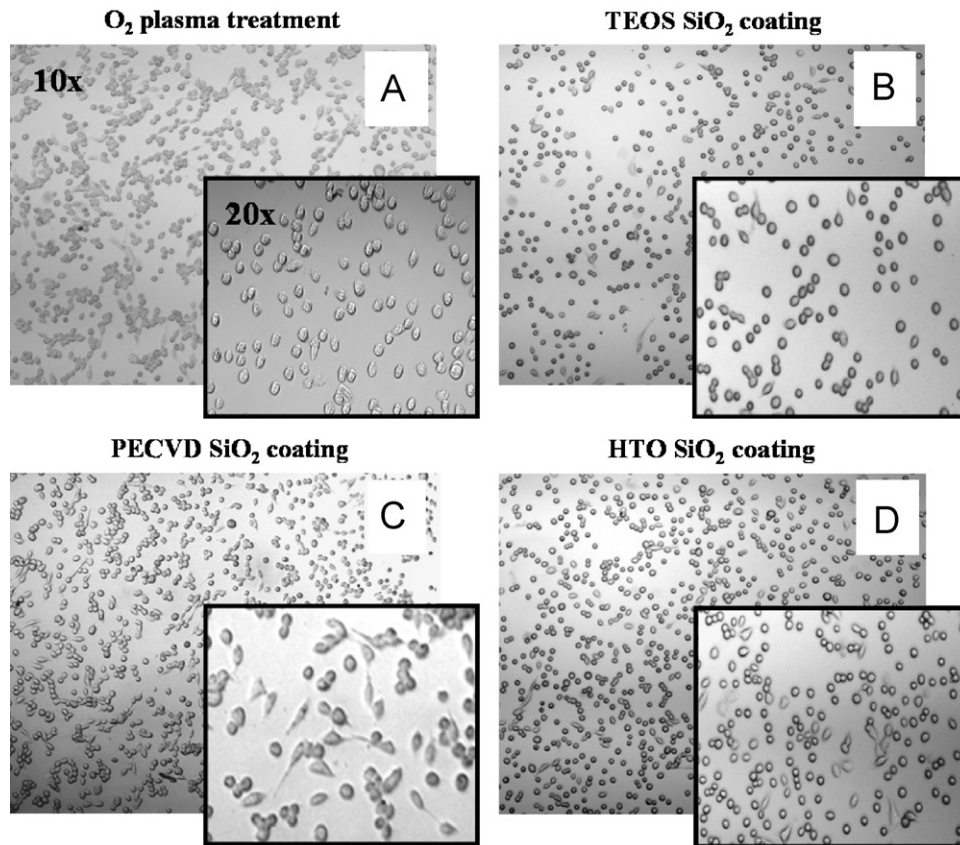


Fig. 5. Morphology of CHO cells grown on SiO₂-coated substrates. Three SiO₂-coated substrates, TEOS, PECVD and HTO, are reported in B, C and D, respectively, and compared to O₂-plasma activated SiO₂ substrates in A. Enlarged views (20 ×) are represented at the foreground of each photograph.

PECVD than by TEOS or HTO. On PECVD-treated slides, about 75% of the circumference presented shreds compared to only about 25% for HTO and TEOS (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. Influence of material surfaces on CHO cells adhesion and morphology

The results obtained with several kinds of materials relevant for bioMEMS development revealed that cell adhesion and morphology are related to distinct material properties. For instance, cells appeared more elongated on APTES-coated glass than on poly-L-lysine-coated glass, whereas adhesion was equally high in both cases. Conversely, a reduction in adhesion was observed for CHO cells on Fn-coated glass compared to APTES-coated glass, whereas no morphological change was observed. On silicon chips treated either with poly-L-lysine or with O₂ plasma, cell adhesion was as high as on poly-L-lysine- or APTES-coated glass, but cells were round shaped. By comparison, LPCVD and PECVD SiO₂ coatings uniformly reduced adhesion while inducing different cell morphology (Fig. 5). This illustrates the absence of correlation between cell morphology and adhesion, a phenomenon which is likely to be related to the cell signalling properties of the

ECM layer. The critical shear stress determined by detachment assays measures the mechanical interaction between cells and substrates. Rupture occurs at the weakest point between cell adhesion molecules and ECM or between ECM and the substrate. Cell elongation is more complex and results from the formation of focal contacts and actin stress fibers. Cell morphology therefore reveals the activation of integrin signaling pathways. This shows that mechanical forces are not the sole determinant of cell shape. An explanation for the disconnection between cell adhesion and cell morphology is likely to reside in the multiple domain organization of most ECM molecules [31]. Different substrates would bind and expose different domains of the same molecules, resulting in differential adhesion and activation of the cell [13]. Typically, cells express multiple integrin receptor isoforms which can bind to the same ligand with different affinities [29]. For example, the observed difference in the amounts of adherent cells between Fn-coated surfaces and APTES surfaces could be explained by a difference in the adsorption of proteins to the substrate as well as orientation and presentation of reactive ligand sites. Some studies have shown that cell attachment is promoted by cellular synthesis of Fn and that changes in the conformation of the Fn cell binding domain affect Fn affinity for its cell surface receptor [32]. Moreover, some authors

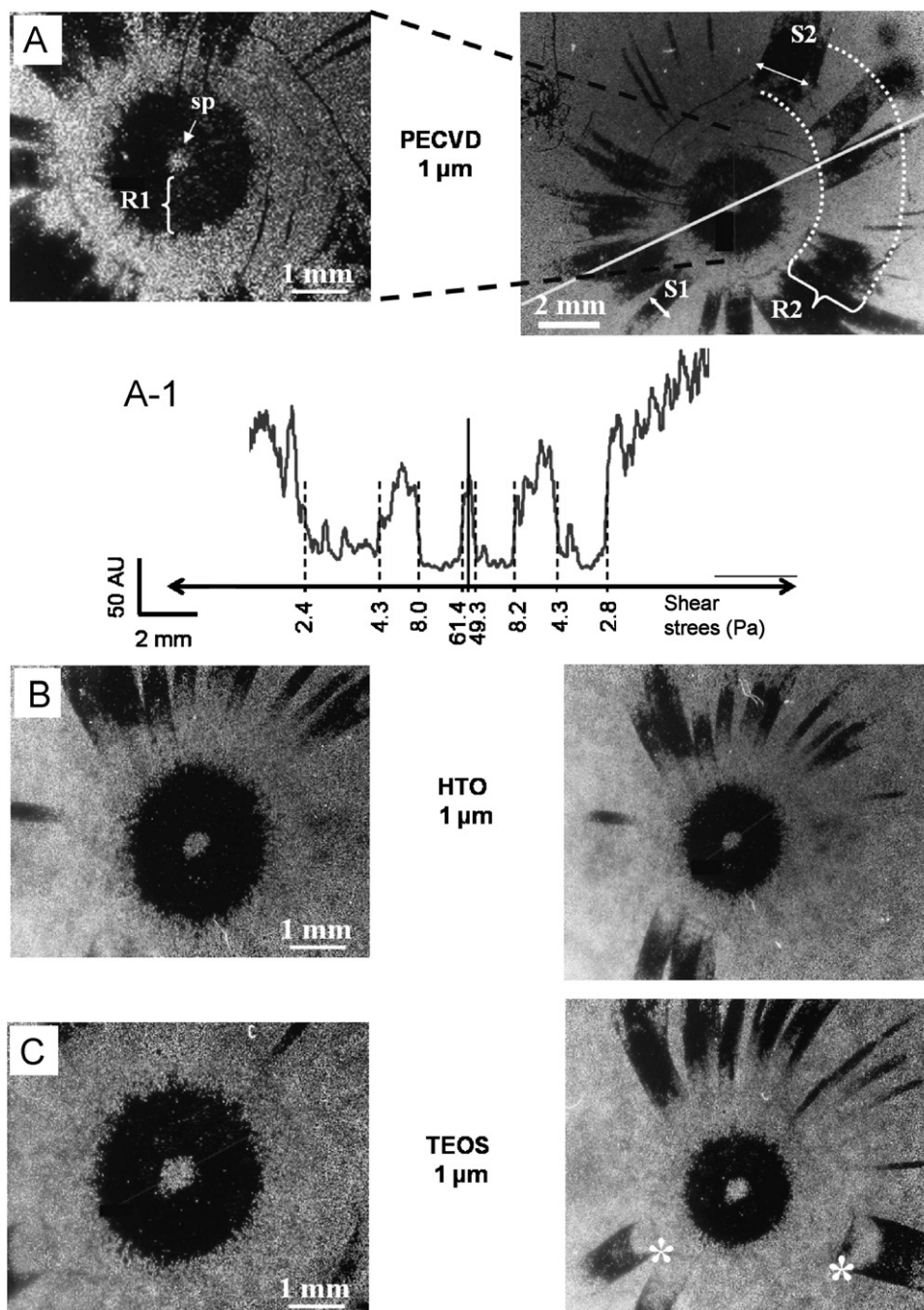


Fig. 6. “Shred detachment” of CHO cells on SiO_2 -coated chips after a radial flow detachment assay. These pictures show remaining cells (white) on SiO_2 -coated substrates (dark) (A: PECVD; B: HTO; C: TEOS, all $1\ \mu\text{m}$ thick) after application of the flow. On left panels, enlarged views of the stagnation point (sp) and of the first detachment ring (R1) are presented. On right panels, the second detachment ring (R2) is observed. Examples of detachment patterns are shown on C, which suggest that cells are removed along radial lines (*). The size and distribution of shreds (e.g. S1 and S2 on A) vary with the type of treatment. The intensity profile is shown in A-1 along the line drawn in A. Intensity cannot be directly linked to cell density but allows to determine the critical shear stresses (Pa) associated to the two detachment modes.

demonstrated that, for fibroblasts for example, attachment and spreading are not simply dependent upon either the vitronectin (Vn) content or the Fn content of the medium but upon adsorption of both serum Vn and Fn [33].

Furthermore, the variation observed here in cellular adhesion strength onto smooth (thermal SiO_2), low roughness (HTO- SiO_2 , TEOS- SiO_2) and rough surfaces

(PECVD- SiO_2) can be due to the nano-scale roughness previously demonstrated to alter cellular adhesion by increasing the surface density of adsorbed Fn [29].

Cell adhesion on surface coatings and cell elongation are governed by a delicate balance of parameters. If high surface energy is required for good adhesion, it is alone not sufficient to influence cell elongation. This is particularly

exemplified here with PDMS-coated substrates. Unmodified PDMS-coated substrates did not promote cell adhesion, as expected for very low surface energy substrates [34–36]. This phenomenon is commonly interpreted in relation to the inability of the hydrophobic substrates to adsorb ECM proteins [37–39] and/or to the inability of cells to organize Fn into a matrix [40].

Conversely, UV/O₃ treatment promoted cell adhesion while independently altering cell morphology. The UV/O₃ treatment was previously demonstrated to oxidize 90% of the methyl side groups to hydroxyl and bridging oxygen species [41]. It is here likely to induce a high quantity of grafted hydroxyl groups, both at the surface and in the bulk polymer, and consecutively a negatively charged surface at physiological pH. Therefore, the possible explanation of a fast reorientation of polar hydroxyl groups from the surface into the bulk material [42] is not likely to be retained in our case. The UV/O₃ treatment would rather create a stable silica-like surface layer [41]. Such a stable SiO₂ stoichiometry was reached in 10 min since no more change in surface energies was observed afterwards. It seems that the buildup of a thicker SiO_x layer hinders further ozone transport to the lower layers and that after 10 min, the ozone can no longer penetrate into the surface [41]. Moreover, our results are in good agreement with previous studies that determined the composition of the UV-ozone reacted PDMS film using FTIR and angle-resolved XPS [41].

This mild oxidation process was slow enough to allow control of the surface energy with the reaction time. Such an incomplete oxidation process has been previously described [41] but never studied in relationship with cellular behaviors. For times lower than 3 min, polar interactions were too scarce to permit adhesion. Five minutes of UV/O₃ exposure were enough to favor adhesion, but cells remained round in shape. The optimum in terms of cell adhesion was achieved after around 7 min UV/O₃ treatment: cells adhered strongly and one third of them were elongated. In this case, the dispersive energy and the amount of H-bonds that induce electrostatic bonds favoring cell adhesion were high (Fig. 1A). At treatment times higher than 7 min, both adhesion and elongated morphology decreased (Figs. 2B and 4). A likely explanation was that negative charges became too numerous and tended to induce electrostatic repulsion of cells [41]. These results indicate that in the case of UV/O₃-modified PDMS-coated surfaces, different critical thresholds in the amount of OH groups and negative charges exist for cell adhesion (5–7 min of exposure) and induction of cell morphology (7 min of exposure). Characterization of substrate properties by liquid–solid interface energy (extended Fowkes method) is insufficient to quantitatively relate the different contributions of polar energies to cell adhesion and morphology.

Controlling cell adhesion with material surface properties address various issues in bioMEMS development [1]. Some cell-on-chip applications require round cells in strong

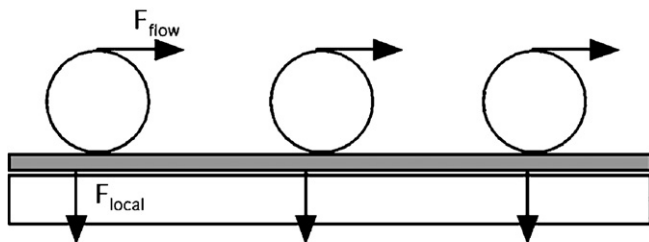
close contact with the substrate. For instance, in planar patch-clamp applications, cells are trapped above a micro-hole, but cell morphology is not a requirement as cell shape does not interfere with electrophysiological measurements [12,43]. Other applications require elongated cells. For instance, the elongated structure of neurons needs to be preserved for electrical extracellular recording of neuronal networks [9,44]. Moreover, cell morphology is one important phenotype in high-throughput screening of parallelly transfected cells [45–47]. O₂ plasma treatment or SiO₂ coating of a silicon substrate gives good adhesion strength with minimal cell elongation. UV/O₃ treatment of PDMS-like-coated glass gives intermediate adhesion and favors elongated cell morphology. Interestingly, controlling spatial UV illumination during O₃ treatment in PDMS-like-coated glass offers local modulation of cell adhesion properties and cell morphology at the micron scale.

4.2. Existence of a collective detachment mode for cells attached on an extracellular matrix layer

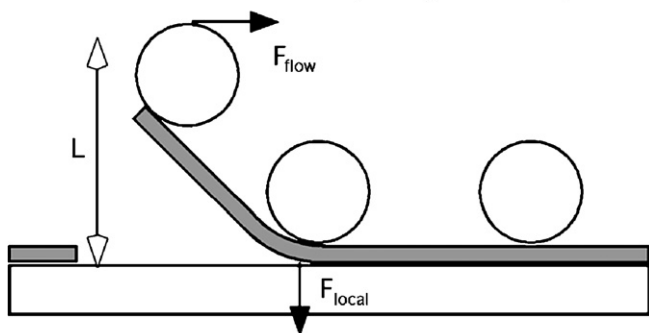
We report that on silicon wafers treated by SiO₂ vapor deposition, cells detached at both intermediate (2–4.5 Pa) and high (>8 Pa) shear stresses. At high shear stress, detachment was complete for all cells at the smaller ring radius. At intermediate shear stress however, detachment was partial, showing that detachment at intermediate shear stress was slower than detachment at high shear stress. Furthermore, inspection of the detachment pattern revealed that cells were removed along radial lines (Fig. 7). This suggested that cells detached collectively at intermediate shear stresses. Since cells were not contacting each other, the only physical link between them was the ECM layer secreted by the cells that covered the SiO₂ surface. Compared to the other surfaces, SiO₂ coatings significantly increased surface roughness. It is possible that the adhesion of the ECM layer on the substrate was reduced. It should be noted that the resistance strength of SiO₂ coatings was high enough to rule out the possibility that shear stress transmitted by the cells to the ECM would have removed the chemical coating [48,49].

On the basis of the previous peeling model of Garrivier et al. [23], we propose a possible explanation for the existence of two detachment shear stresses (Fig. 7). At low shear stress, hydrodynamic force and torque acting on CHO cells is equilibrated by the adhesion of the ECM to the substrate, and cells do not detach. At intermediate shear stress, the ECM layer detaches from the substrate but the cells remain connected together while the ECM is peeled off. Cells thus detach collectively, as it is illustrated in Fig. 7. Conversely, at high shear stress, the ECM layer detaches from the substrate and breaks before the next cell detaches. As a result, cells would detach individually, as illustrated in Fig. 7. The external force that detaches the ECM layer from the surface is proportional to the hydrodynamical shear stress times the lever arm L .

Low shear stress: no detachment



Intermediate shear stress : peeling of ECM layer



High shear stress : breaking of ECM layer

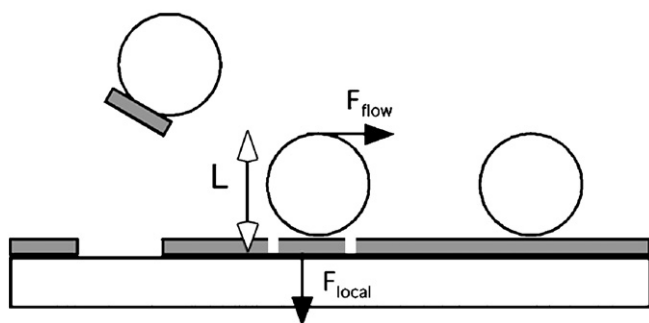


Fig. 7. Possible detachment models of cells closely attached to a surface by ECM. White rectangle: solid substrate. Gray: ECM. White circle: cells. Hydrodynamic forces F_{flow} exerted on cells are transmitted to the ECM-substrate interface (F_{local}). At low shear stress, they do not rupture the ECM. At intermediate shear stress, the ECM is peeled off the substrate but the link between adjacent cells is preserved. At higher shear stress, the ECM breaks between cells. The lever arm (L) is therefore lower in the last case which explains the higher critical shear stress observed.

This lever arm is longer in the second case than in the third one, which explains that cells can be detached at both intermediate and high shear stresses. In summary, the first model in Fig. 7 would correspond to cells away from the inlet of the disk, where the shear stress is unable to detach them (Fig. 6). The second model would correspond to the second ring (R2) in Fig. 6A and the third model to the first ring (R1) in Fig. 6A, where cells are close to the stagnation point. The limit between these behaviors is set by the cohesion strength of the ECM layer compared to its adhesion to the substrate. At shear stresses between “intermediate” (4.5 Pa, second ring R2) and “high” (8 Pa, first ring R1), the probability that a fracture is initiated between the ECM and the substrate is lower than one.

However, when a fracture is initiated, the probability that the ECM breaks before the fracture propagates up to the next cell is close to one. The overall efficiency of cell detachment decreases with shear stress and thus many cells stay on the substrate. At “intermediate” shear stresses (from 4.5 to 2 Pa), the probability that a fracture is initiated between the ECM and the substrate is still lower than one, but when a fracture is initiated, the probability that it propagates up to the next cell before breaking is close to one. Since the lever arm L increases as more cells are detached, the detachment process reinforces itself. This explains that when cells are peeled off in this manner, the efficiency is rather high and almost all cells in the shred are removed. An initiation event is required since cells adjacent to the shred stay on the substrate. Finally, at shear stresses lower than 2 Pa, the forces exerted by the flow are unable to initiate a fracture and almost no cells are removed.

As discussed above, the collective detachment model that we proposed in this paper is based upon the assumption that cells detach because the underlying ECM layer dissociates from the substrate. To support this hypothesis, we aimed to bring some new additional experimental data:

- (i) Fn adsorption onto glass surfaces increases the contact angle with water from 9° to 42° (Fig. 1A). Similarly, Fn or poly-L-lysine adsorption onto SiO_2 coated silicon increases the contact angle by 20° . CHO cells were grown on a SiO_2 -coated silicon slide and submitted to shear stress in the radial flow chamber as described in the manuscript. The contact angle with water was measured in the center region where cells have been detached by the flow. Its value is close to that obtained on plain substrate without Fn coating. This suggests that the ECM layer is removed when cells detach.
- (ii) CHO cells were grown on a SiO_2 -coated silicon slide and submitted to shear stress in the radial flow chamber as described in the manuscript. After fixation, the Fn distribution on the glass surface was visualized with anti-Fn antibodies and fluorescent secondary antibodies, and compared to the position of remaining cells, stained with Hoechst, a nucleus stain. As shown on the Fig. 8, far away from the center of the flow (shear stress ≈ 2 Pa), where no cells were removed, an even Fn staining covers the surface. At closer distances to the center of the flow (shear stress ≈ 8 Pa), Fn staining is discontinuous, and corresponds to location where cells are absent. This shows that Fn, a component of ECM layer, is removed as cells are detached by the flow.

In conclusion, such experimental analysis could support the proposed model of a collective detachment of cells and ECM proteins.

5. Conclusions

A disconnection between cell adhesion and cell morphology was found and is likely to reside in the specific

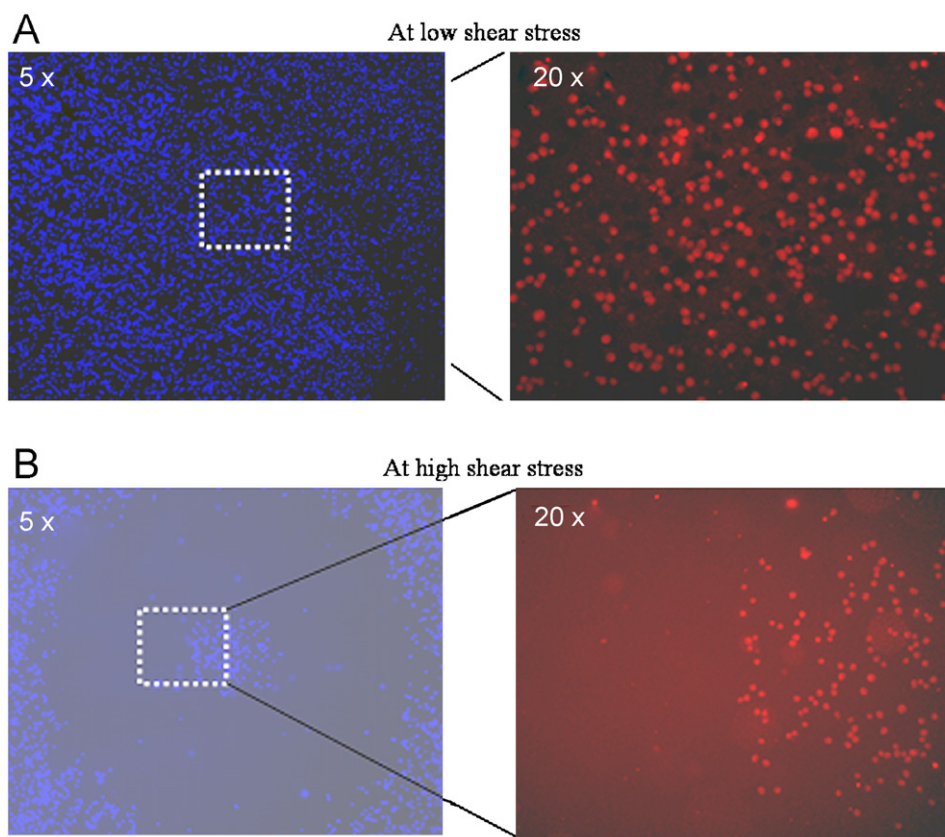


Fig. 8. A collective detachment model of cells and ECM: experimental demonstration. CHO cells were grown on a SiO₂-coated silicon slide and submitted to shear stress in the radial flow chamber (see text). After fixation, the fibronectin distribution on the surface was visualized with anti-fibronectin antibodies and fluorescent secondary antibodies, and compared to the position of remaining cells, stained with Hoechst, a nucleus stain. As shown in (A), far away from the center of the flow (shear stress ≈ 2 Pa), where no cells were removed (left), an even fibronectin staining covers the surface (right). At closer distances to the center of the flow (B) (shear stress ≈ 8 Pa), fibronectin staining is discontinuous (right), and corresponds to location where cells are absent (left). This shows that fibronectin, a component of ECM layer, is removed as cells are detached by the flow.

adsorption of ECM molecule active domains on the surfaces. In the particular case of SiO₂-coated substrates, we report the existence of a collective detachment mode for cells attached on an ECM layer. Cell adhesion and elongation were highly influenced by OH groups and surface charges, as exemplified with PDMS coatings. This material appears quite promising since UV/O₃ treatment is stable and allows local modulation of cell adhesion properties at the micron scale. These findings may direct novel strategies for selecting appropriate materials dedicated to biochips and more fundamentally, also help provide new tools to gain insight into the physico-chemical basis of cell adhesion.

References

- [1] Andersson AS, Backhed F, von Euler A, Richter-Dahlfors A, Sutherland D, Kasemo B. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* 2003;24(20):3427–36.
- [2] Andersson AS, Brink J, Lidberg U, Sutherland DS. Influence of systematically varied nanoscale topography on the morphology of epithelial cells. *IEEE Trans Nanobiosci* 2003;2(2):49–57.
- [3] Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1997;18(24):1573–83.
- [4] Curtis AS, Wilkinson CD. Reactions of cells to topography. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9(12):1313–29.
- [5] Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999;20(23–24):2363–76.
- [6] Mann BK, Tsai AT, Scott-Burden T, West JL. Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition. *Biomaterials* 1999;20(23–24):2281–6.
- [7] David CDE, Lehnert D, Weiland U, Bastmeyer M, Wehrle-Haller, Imhof BA. Cell adhesion on micro- and nanopatterned protein-coated substrates. *PSI Scientific Report*, 2002. p. VII.
- [8] Braun D, Fromherz P. Imaging neuronal seal resistance on silicon chip using fluorescent voltage-sensitive dye. *Biophys J* 2004;87(2):1351–9.
- [9] Fromherz P. Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips. *Chemphyschem* 2002;3(3):276–84.
- [10] Lukas SJ, Ahmed J. Selective protein adsorption on micro-textured P-type and N-type silicon wafers. *Biomed Sci Instrum* 2005;41:181–6.
- [11] Grattarola M, Tedesco M, Cambiaso A, Perlo G, Giannetti G, Sanguineti A. Cell adhesion to silicon substrata: characterization by means of optical and acoustic cytometric techniques. *Biomaterials* 1988;9(1):101–6.
- [12] Sordel T, Garnier-Raveaud S, Sauter F, Pudda C, Marcel F, De Waard M, et al. Hour-glass SiO₂ coating increases the performance of planar patch-clamp. *J Biotechnol* 2006;125(1):142–54.
- [13] Dewez JL, Doren A, Schneider YJ, Rouxhet PG. Competitive adsorption of proteins: key of the relationship between substratum

- surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials* 1999; 20(6):547–59.
- [14] Cuvelier DVC, Viallat A, Bassereau P, Nassoy P. Mimicking cell/extracellular matrix adhesion with lipid membranes and solid substrates: requirements, pitfalls and proposals. *J Phys Condens Matter* 2004;16:S2427–37.
 - [15] Cuvelier D, Rossier O, Bassereau P, Nassoy P. Micropatterned “adherent/repellent” glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Eur Biophys J* 2003;32(4):342–54.
 - [16] Zimerman B, Volberg T, Geiger B. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004;58(3):143–59.
 - [17] Geiger B. Cell biology. Encounters in space. *Science* 2001;294(5547):1661–3.
 - [18] Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:677–95.
 - [19] Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* 1999;76(4):2307–16.
 - [20] Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 2001;3(5):466–72.
 - [21] Wang HB, Dembo M, Wang YL. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279(5):C1345–50.
 - [22] Decave E, Garrivier D, Brechet Y, Fourcade B, Bruckert F. Shear flow-induced detachment kinetics of *Dictyostelium discoideum* cells from solid substrate. *Biophys J* 2002;82(5):2383–95.
 - [23] Garrivier D, Decave E, Brechet Y, Bruckert F, Fourcade B. Peeling model for cell detachment. *Eur Phys J E Soft Matter* 2002;8(1):79–97.
 - [24] Bruckert F, Decave E, Garrivier D, Cosson P, Brechet Y, Fourcade B, et al. *Dictyostelium discoideum* adhesion and motility under shear flow: experimental and theoretical approaches. *J Muscle Res Cell Motil* 2002;23(7–8):651–8.
 - [25] Cozens-Roberts C, Quinn JA, Lauffenburger DA. Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. II. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys J* 1990; 58(4):857–72.
 - [26] Borella M, Plissonnier M, Chartier I, Glade N. Process of localization of chemical or biological species on a substrate, microsystem of analysis or biochip. Patent Nb. WO2006005887, 2006.
 - [27] Chen Jie-Rong WT. Studies of the surface free energy and surface structure of PRFE film treated with low temperature plasma. *J Appl Polym Sci* 1997;63:1733–9.
 - [28] Lehnert T, Laine A, Gijs MAM. Surface modification of SiO₂ micro-nozzles for patch-clamp measurements on-chip. In: Proceedings of the seventh international conference on miniaturized chemical and biochemical analysis systems, 2003. p. 1085–8.
 - [29] Lee MH, Ducheyne P, Lynch L, Boettiger D, Composto RJ. Effect of biomaterial surface properties on fibronectin- α 5 β 1 integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials* 2006;27(9):1907–16.
 - [30] Klemic KGKJ, Reed MA, Sigworth FJ. Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells. *Biosensors Bioelectron* 2002;17(6–7):597–604.
 - [31] Kreis T, Vale R, editors. Guidebook to the extracellular matrix, anchors and adhesion proteins. 2nd ed. 1999.
 - [32] Iuliano DJSS, Truskey GA. Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res* 1993;27(8): 1103–13.
 - [33] Steele JGJG, McFarland C, Dalton BA, Gengenbach TR, Chatelier RC, Underwood PA, et al. Roles of serum vitronectin and fibronectin in initial attachment of human vein endothelial cells and dermal fibroblasts on oxygen- and nitrogen-containing surfaces made by radiofrequency plasmas. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;6(6): 511–32.
 - [34] Schakenraad JM, Busscher HJ, Wildevuur CR, Arends J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J Biomed Mater Res* 1986;20(6):773–84.
 - [35] Dewez JL, Berger VV, Schneider YJ, Rouxhet PG. Influence of substrate hydrophobicity on the adsorption of collagen in the presence of Pluronic F68, albumin, or calf serum. *J Colloid Interface Sci* 1997;191(1):1–10.
 - [36] Lhoest JB, Detrait E, Dewez JL, van den Bosch de Aguilar P, Bertrand P. A new plasma-based method to promote cell adhesion on micrometric tracks on polystyrene substrates. *J Biomater Sci Polym Ed* 1996;7(12):1039–54.
 - [37] Altankov G, Groth T, Krasteva N, Albrecht W, Paul D. Morphological evidence for a different fibronectin receptor organization and function during fibroblast adhesion on hydrophilic and hydrophobic glass substrata. *J Biomater Sci Polym Ed* 1997;8(9):721–40.
 - [38] Dupont-Gillain CC, Alaerts JA, Dewez JL, Rouxhet PG. Patterned layers of adsorbed extracellular matrix proteins: influence on mammalian cell adhesion. *Biomed Mater Eng* 2004;14(3):281–91.
 - [39] Dewez JL, Lhoest JB, Detrait E, Berger V, Dupont-Gillain CC, Vincent LM, et al. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. *Biomaterials* 1998;19(16):1441–5.
 - [40] Altankov GGT. Fibronectin matrix formation by human fibroblasts on surfaces varying in wettability. *J Biomater Sci Polym Ed* 1996;8(4):299–310.
 - [41] Mirley CLKJ. A room temperature method for the preparation of ultrathin SiO_x films from Langmuir–Blodgett layers. *Langmuir* 1995;11(4):1049–52.
 - [42] Hillborg H, Tomczak N, Olah A, Schonherr H, Vancso GJ. Nanoscale hydrophobic recovery: a chemical force microscopy study of UV/ozone-treated cross-linked poly(dimethylsiloxane). *Langmuir* 2004;20(3):785–94.
 - [43] Picollet-D’hahan N, Sordel T, Garnier-Raveaud S, Sauter F, Ricoul F, Pudda C, et al. A silicon-based “Multi-Patch” device for ion channel current sensing. *Sensor Lett* 2004;2:91–4.
 - [44] Gleixner R, Fromherz P. The extracellular electrical resistivity in cell adhesion. *Biophys J* 2006.
 - [45] Schaack BRJ, Combe S, Fouqué B, Berger F, Boccard S, Filhol-Cochet O, et al. A “drop-chip” cell array for high throughput DNA and siRNA transfection combined with drug screening. *Nanobiotechnology* 2005;10.
 - [46] Fukuda J, Sakai Y, Nakazawa K. Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing. *Biomaterials* 2006;27(7):1061–70.
 - [47] Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, et al. Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* 2006; 27(8):1479–86.
 - [48] Madou M. Fundamental in microfabrication: the science of miniaturization. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002.
 - [49] Zeng DFA, Ulmer J, Veliogodskiy A, Fischer P, Spatz J, Ventikos Y, et al. Three-dimensional modeling of mechanical forces in the extracellular matrix during epithelial lumen formation. *Biophys J* 2006;90:4380–91.

Annexe 7 : Poster présenté aux 16^{èmes} rencontres régionales de la recherche en Rhône-Alpes, Alpexpo Grenoble 2006.



Une nouvelle génération de biocapteur pour accélérer la mesure des courants électriques cellulaires

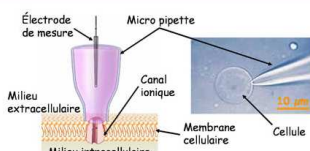
Thomas SORDEL¹, Nathalie PICOLLET D'AHAN¹, Frédérique KERMARREC¹, Fabien SAUTER², Catherine PUDDA², François CHATELAIN¹

¹ Laboratoire Biopuces, CEA Grenoble, ² LETI, CEA Grenoble

Les canaux ioniques

Des portiers cellulaires

- protéines insérées dans la membrane des cellules (~ 1000 sur la membrane d'une cellule de mammifère)
 - régulent les échanges d'ions (Cl⁻, K⁺, Na⁺, Ca²⁺...), donc le courant électrique, entre les milieux intra et extracellulaires.
 - transforment un signal chimique en signal électrique
- => Impliqués dans la contraction musculaire, sensation tactile, communication nerveuse...



Mesurer les courants ioniques par patch-clamp

Technique: isoler un morceau de membrane avec une micropipette de verre.

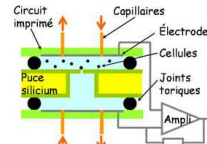
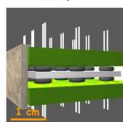
Objectif: mesurer les courants (pA) générés par les flux d'ions.

Contrainte: technique fastidieuse, personnel hautement qualifié, faible rendement: ~ 10 mesures par jour.

=> Non adapté au criblage haut débit de médicaments

Automatiser l'analyse des courants ioniques: principe du microsysteme Multi-Patch

Le concept: de la micropipette de verre à une puce silicium comportant des microtrous structurés => patch-clamp au format planaire pour des mesures en parallèle (brevet CEA WO2004038409)



Les points forts:

- scellement entre membrane cellulaire et puce Silicium
- accessibilité sur les deux faces de la puce
- mesure électrique et dispense de drogues simultanées

Une recherche technologique concurrentielle: 1 leader USA, 3 start-up Europe

=> **Notre positionnement:** système modulaire et flexible, atouts du Silicium, environnement pluridisciplinaire

Un capteur de courants ioniques pour l'industrie et les laboratoires

Dysfonctionnements de canaux ioniques => ~ 30 "canalopathies"

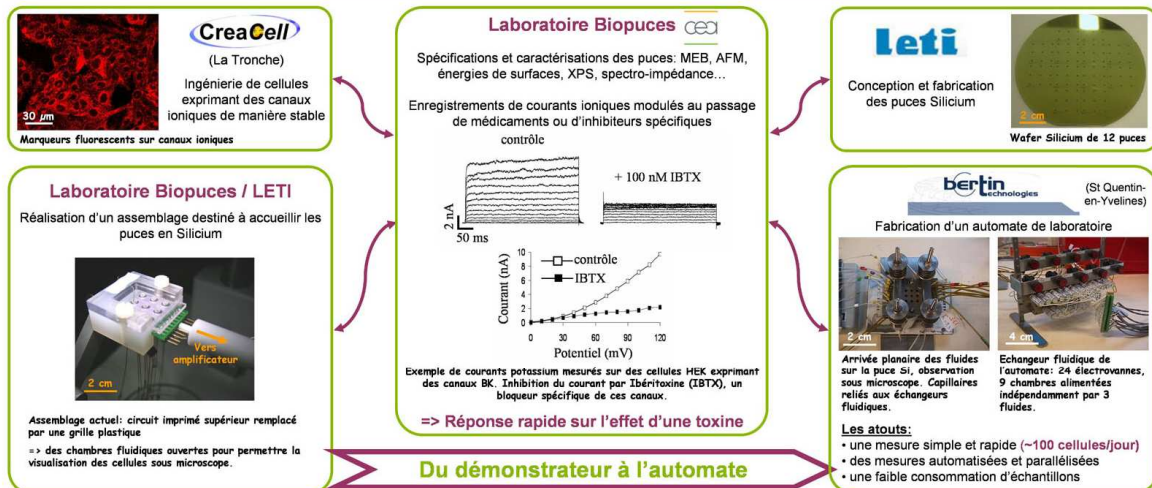


Quels besoins ? Pour quels secteurs ?

- Développement de médicaments: outil de criblage pour les industries pharmaceutiques
- Analyse rapide de toxines précieuses: outil d'investigation abordable pour des laboratoires de recherche

=> Marché de 8 millions d'euros (2004) en émergence (+25% par an)

Quand biologie et technologie convergent



Du β -test aux perspectives commerciales

✓ A court terme...

- Mise au point et transfert de l'automate de laboratoire chez CreaCell (*)

=> premier β -testeur de notre système

Leur besoin: analyse fonctionnelle des lignées cellulaires recombinantes avant la livraison au client

- Production en faible série d'un automate finalisé (Bertin Technologies)

(*) FITT, Fond d'Initiation au Transfert Technologique (2004)

✓ A long terme...[Projet européen, 2006-2009]

Evolution de la technologie vers un prototype intégrant:

- le tri des cellules d'intérêt
- la dispense de très faibles volumes d'échantillons
- une électronique intégrée

=> β -test du prototype dans une industrie pharmaceutique

Références: N. Piccollet-D'ahan *et al*, *Sensors Letters*, 2, 1-4 (2004), X.Wang and M.Li, *DDT*, 1(5), 1-13 (2003), F.J. Sigworth and K.G. Klemeš, *Biophysical J*, 82, 2831-2832 (2002), T. Sordel *et al*, *Proceedings μ TAS* 2004.

Contact et renseignements: Thomas SORDEL, thomas.sordel@cea.fr, Tel: 04 38 78 23 87

Annexe 8 : Poster présenté à la conférence NanoBio Europe 06, Minatec Grenoble.



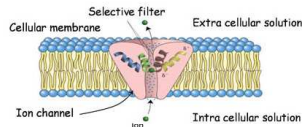
Plasma O₂ treatment on SiO₂ coating improves the cell/surface interaction for patch-clamp measurements on chip

Thomas SORDEL¹, Frédérique KERMARREC¹, Fabien SAUTER², Catherine PUDDA², François CHATELAIN¹, Nathalie PICOLLET D'HAHAN¹

¹ Laboratoire Biopuces, CEA Grenoble, ²LETI, CEA Grenoble

Ion channels and drug screening

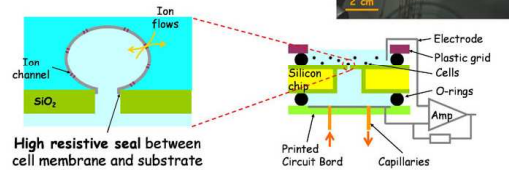
• Ion channels are proteins embedded in the lipid bilayer of the cell membranes and control the flow of ions across the membrane. Ion flow is measured with the patch-clamp technique.



• Ion channels are important drugs targets: 30 channelopathies identified.
 ⇒ A large family of potential drug targets under scrutiny in the drug discovery/screening process.
 ⇒ To increase the throughput of patch-clamp recordings, attempts have been made to replace the traditional pipette of patch-clamp with a planar substrate.

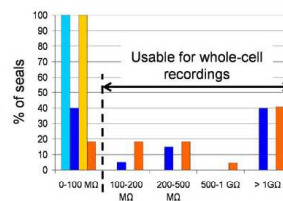
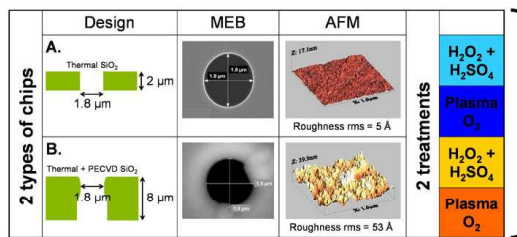
Patch-clamp on chip

• 9 independent patch sites
 • Individual adressable fluidics
 • Flexible, modular and easy handling assembly
 • Limited volume of analysis (10 µL per chamber)



⇒ **Challenge: optimizing the cell / substrate interaction to obtain stable and high resistive seals**

Optimization of the cell/substrate interaction

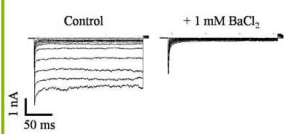


• **Effect of plasma O₂**
 Plasma O₂ increases hydrophilicity of the surface and allows to obtain high resistive seals.
 • **Effect of PECVD coating**
 The chip design B. allows higher seals.
 2 parameters have been increased:
 ⇒ roughness
 ⇒ SiO₂ membrane thickness

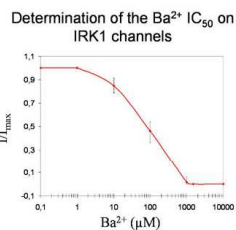
⇒ Chips B. with a plasma O₂ treatment allow to obtain 80% of seals higher than 100 MΩ (so usable for whole-cell recordings), and more than 40% are Giga-seals.
 ⇒ The whole-cell success rate on chips B. is around 65%.

Ionic current recordings

Whole cell K⁺ currents recorded from IRK1 channels expressed in CHO cells

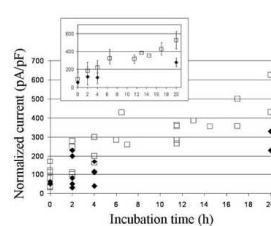


Inward rectifying potassium currents elicited with activating voltage steps from 0 to -120mV with 10mV decrements. Blocking effect is demonstrated on inward K⁺ currents by the unspecific Ba²⁺ divalent (1 mM).



Concentration dependent block of IRK1 with an IC₅₀ = 72 ± 12 µM
 ⇒ **Matches published data**

Time-dependent increase in BK(Ca) channel expression with tetracycline incubation



Current was normalized for cell size, i.e., for cell membrane capacitance. Each displayed point corresponds to one assay on one cell. The inset illustrates the mean current values (± S.E.M.) at selected times.

Currents were recorded from CHO cells stably expressing the BK(Ca) channel in conventional patch-clamp (♦) and in planar patch-clamp (□). Whole-cell current magnitude, evoked by depolarization to 120mV, is plotted as a function of the duration of Tet incubation, starting at time 0.

Conclusion

Cell / substrate interaction

• By modifying chip characteristics and surface properties, we obtain reliable and high resistive seals.
 • We modified two parameters, roughness and SiO₂ membrane thickness. Future works will focus on discriminating the influence of these parameters on seal.

Ionic current recordings

• Our system provides high quality whole-cell recordings that allow to measure currents smaller than 100 pA. We also determine an IC₅₀ for IRK1 channels in accordance with published data.
 • Current research focuses on ionic recordings on cell lines expressing the commonly used hERG ion channel.

References: T.Sordel *et al*, *Journal of biotechnology*, in press, 2006, N. Picollet-D'ahan *et al*, *Sensors Letters*, 2, 1-4 (2004), X.Wang and M.Li, *DDT*, 1(5), 1-13 (2003), F.J. Sigworth and K.G. Kleim, *Biophysical J*, 82, 2831-2832 (2002), T. Sordel *et al*, *Proceedings µTAS* 2004.

Contacts : Thomas SORDEL, thomas.sordel@cea.fr and Nathalie PICOLLET D'HAHAN, picolletdahan@dsvsud.cea.fr

TITRE: Conception et validation d'une « puce patch-clamp » en silicium pour paralléliser et automatiser les mesures électriques sur cellules individualisées.

RESUME:

Le patch-clamp planaire, technique utilisant des microtrous structurés sur un substrat plan, permet d'envisager la parallélisation des mesures de courants ioniques sur cellules individualisées, répondant ainsi à une demande des industries pharmaceutiques. Dans un premier temps, nous avons élaboré un démonstrateur de laboratoire permettant de tester des puces en silicium et démontrer leur potentiel pour l'enregistrement des courants ioniques. Nous avons ensuite procédé à l'amélioration de la sensibilité et des performances de la puce en optimisant l'interaction de la cellule avec les paramètres géométriques et physico-chimiques de la puce et en réduisant la capacité de la puce. Cette démarche a permis de concevoir une puce offrant 80% de scellements exploitables et les validations électrophysiologiques présentées témoignent de la robustesse, de la fiabilité et de la sensibilité du système.

Mots clés: *patch-clamp planaire, puce silicium, interaction cellule/microtrou, étude multiparamétrique, parallélisation, automatisation, canaux potassiques (IRK1, BK(Ca), hERG).*

TITLE: Conception and validation of a silicon “patch-clamp chip” dedicated to parallelized and automated electrical measurements on individual living cells.

ABSTRACT:

Planar patch-clamp, a method to measure ionic currents by using on-planar substrate structured microholes, allows parallelizing measurements as needed by pharmaceutical companies. First, we have made a device allowing us to test our silicon chip and to demonstrate its ability to record ionic currents. Then, we have made improvements to the chip performances and sensitivity by optimizing the interaction of living cells with geometrical and physico-chemical parameters of the chip and by decreasing the chip capacitance. Thanks to this method, we have designed a chip leading to more than 80 % of usable seals and electrophysiological experiments presented in this study reveal the robustness, the reliability and the sensitivity of the device.

Keywords: *planar patch-clamp, silicon chip, cell/microhole interaction, multiparametric study, parallelization, automation, potassium channels (IRK1, BK(Ca), hERG).*

Laboratoire d'accueil:
Laboratoire Biopuces, CEA Grenoble / DSV / DRDC, 17 rue des Martyrs, 38054
GRENOBLE Cedex 9